

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DEL MÓDULO CARBOXI-TERMINAL DE LAS
ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS EN LA REGULACIÓN DE
LA SÍNTESIS DE $\cdot\text{NO}$: CARACTERIZACIÓN DEL
RECEPTOR NUCLEAR E75, UN SENSOR DE ÓXIDO
NÍTRICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Clara Aicart Ramos

Bajo la dirección del doctor

José Ignacio Rodríguez Crespo

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DEL MÓDULO CARBOXI-TERMINAL
DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS EN LA
REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE •NO**

**CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR
E75, UN SENSOR DE ÓXIDO NÍTRICO**

Tesis doctoral presentada por:

CLARA AICART RAMOS

Director:

JOSÉ IGNACIO RODRÍGUEZ CRESPO

Madrid, 2013

ABREVIATURAS

RESUMEN EN INGLÉS

BLOQUE I: Papel del módulo carboxi-terminal de las Óxido Nítrico Sintetas en la regulación de la síntesis de •NO.

INTRODUCCIÓN

1. El Óxido nítrico.....	5
2. Las Óxido Nítrico Sintetas.....	6
3. La Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS-NOS1).....	15
3.1. Dimerización de la nNOS.....	15
3.2. Localización subcelular de la nNOS.....	16
3.3. Fosforilación de la nNOS.....	16
3.4. Interacción de la nNOS con otras proteínas.....	18
3.5. Funciones fisiológicas y patológicas de la nNOS.....	19
4. La Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS-NOS3).....	20
4.1. Los ciclos acilación-desacilación de la eNOS.....	21
4.2. La localización subcelular de la eNOS.....	23
4.3. La fosforilación de la eNOS.....	24
4.4. Interacción de la eNOS con otras proteínas.....	27
4.5. Funciones fisiológicas de la eNOS.....	29
5. La Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS-NOS2).....	30
5.1. Papel funcional de la extensión C-terminal de la iNOS.....	32
5.2. La fosforilación de la iNOS.....	33
5.3. La palmitoilación de la iNOS.....	33
5.4. Interacción de la iNOS con otras proteínas.....	34
6. La familia de la Proteína Quinasa D.....	36
6.1. Estructura y dominios de las PKDs.....	36
6.2. Mecanismos celulares de activación de las PKDs.....	39
6.3. Distribución subcelular de las PKDs.....	40
6.4. Funciones de las PKDs.....	43

OBJETIVOS

1. Óxido nítrico sintasa endotelial.....	49
2. Óxido nítrico sintasa neuronal.....	50
3. Óxido nítrico sintasa inducible.....	50

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Reactivos de uso general.....	55
2. Líneas celulares.....	55
3. Medios de cultivo.....	55
4. Plásmidos.....	56

MÉTODOS

1. Clonación en el vector de expresión en bacterias pCWori, expresión recombinante y purificación de las construcciones de las tres NOSs.....	58
1.1. Dominio reductasa de la eNOS.....	58
1.2. nNOS completa y dominios hemo-oxigenasa y reductasa.....	58
1.3. iNOS completa y dominio reductasa y sus respectivos mutantes delecionados en el extremo C-terminal Δ5, Δ10 y Δ15.....	58

2. Clonación, expresión recombinante y purificación del dominio catalítico de PKD1 fusionado a GST.....	58
3. Clonación en el vector de expresión en bacterias pCWori, expresión recombinante y purificación del dominio PDZ1 de EBP50.....	59
4. Clonación en el vector de expresión en bacterias pKLSLT, expresión recombinante y purificación de CAP70 completa.....	59
5. Clonación de las construcciones de PKD1 en el vector de expresión en células de mamífero pEFBOS.....	59
6. Clonación de las construcciones de eNOS bovina en el vector de expresión en células de mamífero pEFBOS, previa eliminación de la GFP.....	59
7. Clonación de las construcciones para los ensayos de doble híbrido de levadura de las construcciones de PKD1, nNOS y CAPON.....	59
8. Ensayo quinasa <i>in vitro</i>	60
9. Identificación del residuo fosforilado en eNOS y en nNOS por PKD1 mediante espectrometría de masas o MALDI TOF/TOF.....	60
10. Cultivos celulares y transfección.....	60
11. Inmunofluorescencia de células fijadas.....	60
12. Extractos proteicos e inmunoprecipitación.....	61
13. Transferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>).....	61
14. Ensayo de reparación de la herida (<i>wound healing</i>).....	61
15. Medida de los niveles intracelulares de •NO mediante DAF2-DA.....	61
16. Ensayo de reducción de citocromo c.....	62
17. Ensayo de reoxidación de flavinas.....	62
18. Determinación de la liberación de •NO.....	63
19. Estudio de interacciones proteína-proteína mediante el sistema del doble híbrido de levadura.....	63
19.1. Transformación de levaduras por acetato de litio.....	64
19.2. Ensayo de β -galactosidasa.....	65

RESULTADOS

BLOQUE 1: La fosforilación de la Ser1179 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS) y la producción de •NO.

1. La eNOS es un nuevo sustrato de PKD1.....	69
2. La fosforilación de la eNOS en la Ser1179 por parte de PKD1 o PKD2 da lugar a un aumento en la síntesis de óxido nítrico.....	71
3. El tratamiento de células BAEC que sobreexpresan PKD con VEGF ocasiona una rápida translocación de la eNOS endógena, así como de la PKD, mientras que el tratamiento con PDBu, moviliza la PKD sin que la eNOS modifique su localización.....	76
4. PKD y eNOS forman un complejo en células transfectadas que implica al dominio NADPH de eNOS, aunque su extremo C-terminal no es necesario para esta interacción.....	77
5. Ensayo de reparación de herida: el tratamiento de las células BAEC con un inhibidor específico de PKD disminuye su migración <i>in vitro</i>	80

BLOQUE 2: La fosforilación de la Ser1412 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS) y la producción de •NO

1. PKD1 y nNOS forman un complejo en células transfectadas aunque el extremo C-terminal de PKD1 no es necesario para esta interacción.....	82
2. La asociación entre PKD1 activa y la nNOS aumenta debido a la localización subcelular conferida por su dominio de homología a pleckstrina.....	83
3. La nNOS es un nuevo sustrato de PKD1.....	85
4. En células vivas, la Ser1412 de la nNOS es fosforilada por PKD1.....	87
5. La fosforilación de la nNOS por PKD1, conlleva su activación.....	88

BLOQUE 3: La interacción del extremo C-terminal de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) con proteínas PDZ regula su activación y la producción de •NO

1. Clonación, expresión recombinante y purificación de mutantes delecionados en el extremo C-terminal de la iNOS.....	92
2. Clonación, expresión recombinante y purificación de las proteínas con dominios PDZ: EBP50 y CAP70.....	93
3. Medida de la actividad de la iNOS, mediante el ensayo de reducción de citocromo c.....	93
3.1. La deleción progresiva del extremo C-terminal aumenta la capacidad de reducción de citocromo c, tanto del dominio reductasa como de la proteína completa iNOS.....	93
3.2. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de reducción de citocromo c.....	93
4. Ensayo de reoxidación de flavinas.....	94
4.1. La deleción progresiva del extremo C-terminal del dominio reductasa silvestre de la iNOS aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas.....	94
4.2. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con la proteína PDZ EBP50, aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas.....	96
5. Medida de la actividad de la iNOS, mediante la determinación de la liberación de •NO.....	97
5.1. La deleción de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de la iNOS completa aumenta su capacidad de síntesis de •NO.....	97
5.2. La interacción de la iNOS completa silvestre con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de síntesis de •NO.....	97

DISCUSIÓN

BLOQUE 1: La fosforilación de la Ser1179 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS) y la producción de •NO.....	101
--	------------

BLOQUE 2: La fosforilación de la Ser1412 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS) y la producción de •NO.....	106
--	------------

BLOQUE 3: La interacción del extremo C-terminal de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) con proteínas PDZ regula su activación y la producción de •NO.....	109
--	------------

<u>CONCLUSIONES</u>.....	115
---------------------------------	------------

<u>REFERENCIAS</u>.....	119
--------------------------------	------------

BLOQUE II: Caracterización del receptor nuclear E75, un sensor de óxido nítrico.

INTRODUCCIÓN

1. Los receptores nucleares: estructura y función.....	139
2. Señalización inducida por ecdisona y el receptor nuclear E75 en insectos.....	141
2.1 Los receptores nucleares Rev-erbs, los ortólogos de E75 en mamíferos.....	143
3. El grupo hemo.....	144
3.1. La coordinación del hierro.....	146
3.2. Modificaciones del grupo hemo: unión covalente a la cadena polipeptídica.....	148
3.3. Breve introducción al análisis espectrofotométrico de hemoproteínas.....	149

<u>OBJETIVOS</u>.....	153
------------------------------	------------

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Reactivos de uso general.....	157
2. Líneas celulares: bacterias.....	157
3. Medios de cultivo para bacterias.....	157
4. Plásmidos. Plásmido pCWori (pTacTac).....	157

MÉTODOS

1. Clonación de las distintas construcciones de los LBDs de E75 de los diferentes insectos en el vector de expresión recombinante en bacterias pCWori.....	158
1.1. Clonación de los LBDs de E75 de los diferentes insectos.....	158
1.2. Clonación de los mutantes puntuales del LBD de E75B de <i>O. fasciatus</i> : mutagénesis dirigida.....	158
1.3. Construcción de las proteínas quimera del LBD de E75 de <i>Drosophila melanogaster</i> - <i>Oncopeltus fasciatus</i> (<i>Dros-Onc</i> y <i>Onc-Dros</i>)	158
2. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de los LBDs de E75 de los distintos insectos.....	160
3. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de <i>O. fasciatus</i> en la cepa RP523 deficiente en la síntesis de hemo.....	160
4. Reducción del hierro del grupo hemo y unión de los gases CO y •NO.....	160
5. Formación de un hemocromo con piridina.....	161
6. Análisis mediante HPLC de la unión covalente del grupo hemo a los LBDs.....	161
7. Dicroísmo circular.....	161
8. Aislamiento y caracterización de hemopéptidos.....	161
9. Análisis por espectrometría de masas.....	162
10. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	163
11. Intentos de cristalización de las hemoproteínas recombinantes.....	163

RESULTADOS

BLOQUE 1: Caracterización de los LBDs de E75 de diferentes insectos y descripción de la unión covalente del hemo a la cadena polipeptídica en algunos de ellos.

1. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV/visible de los LBDs de E75 de <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> y <i>Bombyx mori</i> purificados.....	167
2. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV/visible de los complejos Fe(II)CO y Fe(II)NO de los LBDs de E75 de los tres insectos.....	169
3. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica de los LBDs.....	171
4. El LBD de E75 de <i>O. fasciatus</i> une el grupo hemo covalentemente.....	173
5. Espectros de piridina hemocromo de los LBDs de E75 de los tres insectos.....	173
6. Análisis proteómico del LBD de E75 de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	175
7. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de <i>O. fasciatus</i> E75 LBD en la cepa de <i>E. coli</i> RP523 deficiente en la biosíntesis de hemo.....	178
8. Caracterización de las proteínas quimera <i>Dros-Onc</i> y <i>Onc-Dros</i>	179
9. Caracterización de los mutantes Glu158Lys y Met245Thr del LBD de E75 de <i>O. fasciatus</i>	182
10. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de <i>Blattella germanica</i>	183

BLOQUE 2: Obtención de cristales de los LBD de E75 de *D. melanogaster*, *B. mori* y *O. fasciatus*.....

185

DISCUSIÓN.....

189

CONCLUSIONES.....

199

REFERENCIAS.....

203

aa	Aminoácidos
2',3'-ADP	Ácido adenílico
2',5'-ADP	2',5'-Adenosin-difosfato
AF-1	Región de activación de la función 1
AF-2	Región de activación de la función 2
AH	Elemento autoinhibitorio
Akt/PKB	Proteína quinasa B
Ala	Alanina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
AMPK	del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>
APT1	del inglés <i>Acyl-protein thioesterase-1</i>
L-Arg	L-Arginina
ASK1	del inglés <i>Apoptosis signal regulating kinase 1</i>
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
3-AT	3-aminotriazol
ATP	Adenosin trifosfato
BAEC	del inglés <i>Bovine aortic endothelial cells</i>
BH ₂	Dihidrobiopterina
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
BMAL1	del inglés <i>Brain, muscle Arnt-like protein-1</i>
BMPs	del inglés <i>Bone morphogenteic proteins</i>
B1R	del inglés <i>B-1-kinin receptor</i>
8-Br-cAMP	8-bromoadenosin-3',5'-monofosfato cíclico
8-Br-cGMP	8-bromoguanosin-3',5'- monofosfato cíclico
BSA	del inglés <i>Bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺ /CaM	Calcio-calmodulina
CaM	Calmodulina
CaM-L	Secuencia de unión a calmodulina
CAMK	del inglés <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CaMKI	del inglés <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>
CaMKII	del inglés <i>Calcium/calmodulin dependent protein Kinase II</i>
CAP70	del inglés <i>CFTR-Associated Protein of 70 kDa</i>
CAPON	del inglés <i>Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS</i>
Cav-1	Caveolina-1
CERT	del inglés <i>Ceramide transfer protein</i>
CFTR	del inglés <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance</i>
cGK-I/PKG	del inglés <i>cGMP-dependent protein kinase II o Protein kinase G</i>
ChCooA	del inglés <i>CO activator protein of Carboxydothemus hydrogenoformans</i>
Chk1	del inglés <i>Checkpoint kinase 1</i>
CN	Región con carga negativa
CO	Monóxido de carbono
COX-2	del inglés <i>Cyclooxygenase-2</i>
CRD	del inglés <i>Cysteine-rich domain</i> o dominio rico en cisteínas
CREB	del inglés <i>Cyclic AMP-response element-binding</i>
CRM-1	del inglés <i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
CT1	Banda de transferencia de carga
CW	Espectros de EPR onda continua o en modo estacionario
CYP4	Familia CYP4 de los citocromos P450
CYPOR	NADPH-citocromo P450 reductasa
Cys	Cisteína
DAG	Diacilglicerol
DAF2-DA	4,5-diaminofluoresceína diacetato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD	Dominio de unión a DNA
DC	Dicroísmo circular
DETA-NO	(Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil)amino]diacen-1-ium-1,2-diolato
DHR3	del inglés <i>Drosophila hormone receptor 3</i>
DLC8/DYNLL1	del inglés <i>Dynein Light Chain 8</i>
DLC8-L	Sitio de unión de DLC8/DYNLL1

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA codificante
DNA-AD	Dominio de activación de la transcripción del factor de transcripción GAL4
DNA-BD	Dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4
DTT	Ditiotritol
E75	del inglés <i>Ecdysone-induced protein 75</i>
EBP50	del inglés <i>Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein of 50 kDa</i>
EcR	Receptor de ecdisona
EcR/USP	Heterodímero constituido por receptor de ecdisona / ultraespiráculo
<i>Eip75B</i>	Es el gen <i>Ecdysone-induced protein 75B</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
ERM	del inglés <i>Ezrin-radixin-moesin</i>
ERK	del inglés <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FBS	Suero bovino fetal
Fe(II)CO	Aductos de la proteína reducida en presencia de CO
Fe(II)NO	Aductos de la proteína reducida en presencia de •NO
FGFR1	del inglés <i>Fibroblast growth factor receptor-1</i>
FMN	Flavin mononucleótido
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución
βFtz-F1	del inglés <i>Beta fushi tarazu-factor 1</i>
<i>Gab1</i>	del inglés <i>Grb2-associated binder 1</i>
GFP	del inglés <i>Green fluorescent protein</i>
GI	Gastrointestinales
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
GPCRs	del inglés <i>G protein-coupled receptors</i>
GST	Glutathion sintetasa transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HDAC	Histona deacetilasa
His	Histidina
HO	Hemo-oxigenasa
<i>HOX</i>	del inglés <i>Homeotic genes</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR3	del inglés <i>Hormone receptor 3</i>
HR3A	del inglés <i>Hormone receptor 3 isoform A</i>
HRE	del inglés <i>Hormone-response element</i>
Hsp90	del inglés <i>Heat shock protein 90</i>
HUVEC	del inglés <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF-1	del inglés <i>Insulin-like growth factor 1</i>
Ifn-γ	Interferón γ
IKV	Ensayo quinasa <i>in vitro</i>
Ile	Isoleucina
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
IREs	del inglés <i>Iron-Responsive Elements</i>
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
Kidins220	del inglés <i>Kinase D interacting substrate of 220 kDa</i>
LBD	Dominio de unión a ligando
Leu	Leucina
L-NAME	L-NG-nitroarginina metil éster
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolisacárido
Lys	Lisina
MALDI	Ionización por desorción láser asistida por una matriz
MALDI-TOF	Sistema de ionización MALDI con un analizador de tiempo de vuelo
MAPK	del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	del inglés <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDCK	del inglés <i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i>
Met	Metionina
MetSRed	Metionina Sintasa Reductasa

MLCK	del inglés <i>Myosin light-chain kinase</i>
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NADPH	Fosfato de nicotín-adenil dinucleótido
NAP110	del inglés <i>NOS-associated protein-110 kDa</i>
NCoR	del inglés <i>Nuclear receptor Co-Repressor</i>
NEDA	N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorado
NF-κB	del inglés <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NHE3	del inglés <i>Na⁺/H⁺ exchanger type 3</i>
HERF	del inglés <i>Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factors</i>
NIDD	del inglés <i>nNOS-interacting DHHC domain-containing protein with dendritic mRNA</i>
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDARs	Receptores de glutamato ionotrópicos de tipo N-Metil-D-Aspartato
•NO	Óxido nítrico
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
NOSs	Óxido Nítrico Sintetas
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa neuronal
NR1	del inglés <i>Novel Reductase 1</i>
NTA	Ácido nitrilotriacético
N-terminal	Amino-terminal
PAGE-SDS	Geles de poliacrilamida en presencia de SDS
PARP	del inglés <i>Poly-ADP-ribose polymerase</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDBu	forbol-12,13-dibutirato
PDGF	del inglés <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDZ	del inglés <i>Postsynaptic density-95/ Discs-large A/ Zonula occludens-1 homology</i>
PDZ-L	motivo de unión a dominios PDZ
PECAM-1 o CD31	del inglés <i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i> también llamada CD31
PEG	Polietilenglicol
PH	del inglés <i>Pleckstrin homology domain</i> o dominio de homología a pleckstrina
Phe	Fenilalanina
PI4KIIIβ	Fosfatidil-inositol-4 quinasa IIIβ
PIP ₂	Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato
PKA	del inglés <i>Cyclic AMP-dependent protein kinase</i> (Proteína Quinasa A)
PKB	Proteína Quinasa B o Akt
PKC	Proteína Quinasa C
PKD	Proteína Quinasa D
PKD1 ^{ΔCRD}	Mutantes de delección que carecen del dominio CRD
PKD1 ^{ΔPH}	Mutantes de delección que carecen del dominio PH
PKD1 ^{ca}	Mutante de PKD1 constitutivamente activo (doble mutante Ser ^{744/748} Glu)
PKD1-cat activo	Dominio catalítico activo de PKD1 fusionado a la proteína GST
PKD1 ^{ki}	Mutante de PKD1 quinasa inactivo (mutante sencillo Asp ⁷³³ Ala)
PKG	Proteína Quinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pro	Prolina
PSD93	del inglés <i>Postsynaptic density protein-93</i>
PSD95	del inglés <i>Postsynaptic density protein-95</i>
PYK2	del inglés <i>Proline-rich tyrosine kinase</i>
Quimera Dros-Onc	constituida por la combinación del fragmento N-terminal del LBD de E75 de <i>Drosophila</i> (aa 341-446) y el fragmento C-terminal del LBD de E75 de <i>Oncopeltus</i> (aa 194-348).
Quimera Onc-Dros	constituida por la fusión del fragmento N-terminal del LBD de E75 de <i>Oncopeltus</i> (aa 88-199) y el fragmento C-terminal del LBD de E75 <i>Drosophila</i> (aa 440-604).
Rac	del inglés <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RARs	del inglés <i>Retinoic acid receptors</i>
RAR/RXR	Heterodímero <i>retinoic acid receptor / retinoid X receptor</i>
RasGRP	del inglés <i>Ras guanyl nucleotide releasing protein</i>
Rev-erba	Receptor nuclear Rev-Erb alpha también llamado NR1D1 (<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>)

Rev-erb β	Receptor nuclear Rev-Erb beta también llamado NR1D2 (<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2</i>)
RevDR-2	Elemento de respuesta Rev de repetición directa
RIN1	del inglés <i>Ras interaction/interference 1</i>
RIPA	tampón de ensayo de radioimmunoprecipitación
RISC	del inglés <i>RNAi-Induced Silencing Complex</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
iRNA	RNA de interferencia
mRNA	RNA mensajero
shRNA	del inglés <i>short hairpin RNA</i>
siRNA	del inglés <i>small interfering RNA</i>
RORE	del inglés <i>Retinoic acid receptor-related receptor response element</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RrCooA	del inglés <i>CO activator protein of Rhodospirillum rubrum</i>
RT	Temperatura ambiente
Runx2	del inglés <i>Runt-related transcription factor 2</i>
RXR α	del inglés <i>Retinoid X receptors</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
SHP(en bloque NOSs)	del inglés <i>Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SHP (en bloque E75)	del inglés <i>Sphaeroides heme protein</i>
SMRT	del inglés <i>Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor</i>
SMRTER	del inglés <i>NCoR/SMRT-related molecule in Drosophila</i>
SMTC	S-metil-L-tiocitrulina
SSH1L	del inglés <i>Slingshot 1 like</i>
TGF- β	del inglés <i>Transforming growth factor beta</i>
TGN	Red trans-Golgi
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UAS	del inglés <i>Upstream Activation Sequence</i>
USP	Ultraespiráculo
UV/visible	Ultravioleta/visible
Val	Valina
VASP	del inglés <i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VEGF	del inglés <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	del inglés <i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
X- β -Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

Nitric oxide ($\bullet\text{NO}$) is an unorthodox messenger molecule, which has numerous molecular targets. It acts in key physiological processes including neurotransmission, vascular tone and the immune response, but it also regulates gene transcription and mRNA translation, and produces post-translational modifications of proteins (e.g. by ADP ribosylation or S-nitrosylation). $\bullet\text{NO}$ is transient, small and easily diffusible, and its availability is solely regulated at the synthesis level by nitric oxide synthase (NOS) enzymes. Three major NOS isoforms that differ in their tissue localization, regulation and function, have been identified: neuronal NOS (nNOS or NOS1) and endothelial NOS (eNOS or NOS3), and inducible NOS (iNOS or NOS2). In mammalian cells all three isoforms of NOS are highly regulated complex enzymes and their activity is modulated by dimerization equilibrium, degradation rate, subcellular localization, interaction with other proteins and post-translational modifications.

eNOS is distinguished by the presence of myristoylation (Gly2) and palmitoylation (Cys15 and Cys26) sites at the amino terminus that are involved in subcellular targeting of the protein. nNOS is longer than the other isoforms due to the presence of a PDZ (PSD-95/DLG/ZO-1) domain at the amino terminus that serve a similar function and a polypeptide stretch known to interact with dynein light chain DYNLL1. iNOS is also palmitoylated on Cys3 and this palmitoylation is necessary for its activity in both transfected and induced cells. The C-terminal four amino acids of iNOS interact with proteins that contain PDZ domains resulting in the translocation of iNOS to the cellular apical domain.

All NOSs share 50-60% overall amino acid sequence homology and have similar cofactor requirements. The NOSs are functional dimers, which each monomer containing an N-terminal oxygenase domain with binding sites for L-arginine, tetrahydrobiopterin (BH_4), and a tetracoordinated zinc atom, and a reductase domain with binding sites for FMN, FAD and NADPH connected by a linker containing a Ca^{2+} /calmodulin (CaM) binding site. nNOS and eNOS are constitutively expressed and they are directly activated by agonist-induced elevation of intracellular Ca^{2+} , binding of Ca^{2+} to CaM, and subsequent binding of CaM to NOS. In contrast, iNOS binds CaM in essentially a Ca^{2+} -independent, irreversible manner, and its activity is transcriptionally regulated by cytokines, bacterial lipopolysaccharide and other agents, rather than by changes in the Ca^{2+} concentration.

NOSs catalyze the synthesis of $\bullet\text{NO}$ through two serial monooxygenase reactions analogous to those of the NADPH-dependent cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR) systems. They oxidize L-arginine to the stable intermediate N-hydroxy-L-arginine, and subsequently oxidize this intermediate to $\bullet\text{NO}$ and citrulline. Electrons are transferred from NADPH, through the flavins FAD and FMN, to the heme iron, where molecular oxygen is bound and activated. The redox potentials are poised thermodynamically to make this occur. The last step is rate-limiting, occurs in *trans* from reductase domain of one polypeptide to oxygenase domain of the other, and is uniquely triggered by conformational changes induced by Ca^{2+} /CaM binding.

CYPOR and the NOS reductase domains share close homology, placing NOS reductase domains into the class of flavoprotein dehydrogenases containing both FAD and FMN on the same polypeptide chain, which also includes 3 mammalian proteins: CYPOR, Methionine Synthase Reductase (MetSRed), and *Novel reductase 1* (NR 1). The FMN-binding domain is homologous to small electron-carrier flavodoxins, whereas the FAD- and NADPH-binding domains associate into a "FNR-like unit", related to ferredoxin-NADP⁺ reductase. An α -helical connecting domain (CD) orients the flanking FMN- and FAD-binding domains to align the two flavins. Despite the similarities of NOSs to these enzymes, they are unique in that their reductase activity can be modulated by CaM. CaM induces a conformational change leading to increases in cytochrome c reduction, ferricyanide reduction, NADPH oxidation, and the rate of electron transfer through the flavins.

All three NOS isoforms are self-sufficient enzymes with two major functional domains fused into a single polypeptide, and those domains constitute the catalytic core. NOSs are exquisitely tuned to control $\bullet\text{NO}$ production. The constitutive NOSs contain a 40-50-residue autoinhibitory insert (AH) in the FMN-binding domain that interferes with CaM binding and inhibits both intra- and inter-module electron transfers. Phosphorylation of this regulatory element further modulates their activity. The CD2A regulatory element present in the connecting domain (CD) of the constitutive NOSs is predicted to contribute to the observed Ca^{2+} /CaM dependence with interaction with the CaM-binding peptide. When compared to CYPOR, all of the NOS isoforms contain approximately 21-42 additional amino acids at the very C-

terminal end of the reductase module, forming a “tail” not present in CYPOR and crystallographic data indicate that it adopts a helical conformation. This α -helix is known to function as a physical “lid” in the reductase domain that impedes proper electron transfer. The rate of •NO synthesis among the three isoforms is inversely correlated to the length of the C-terminal tail. The removal of these residues from all three isoforms yields enzymes with markedly higher activity. Although the tail region is a regulatory element intrinsic to NOS itself, makes attractive target for *in vivo* modulation via interactions with other proteins or post-translational modifications such as phosphorylation. Accordingly, several laboratories noted that both nNOS and eNOS contained serine/threonine protein kinase phosphorylation sites in the tail region of the reductase domain, Ser1177 for human eNOS and Ser1412 for rat nNOS. The Ser residue located at the C-terminal α -helix is immersed within a consensus Akt/PKB-dependent phosphorylation consensus sequence (RXRXX(S/T)X, herein RLRSESI in nNOS and RIRTQSF in eNOS). It has been reported that eNOS is phosphorylated on Ser1179 or Ser1177 in human and bovine eNOS, respectively, by Akt/PKB and AMPK both *in vitro* and in a cellular environment. Furthermore, the activity of at least six protein kinases (Akt/PKB, AMPK, PKA, cGK-I/PKG, Chk1 and CaMKII) converge on the same eNOS activatory Ser, and in all cases protein phosphorylation correlates with activation and increased •NO synthesis. The equivalent Ser residue of nNOS (Ser1412 in rat nNOS) is phosphorylated by Akt/PKB, PKA and AMPK in neurons and in skeletal muscle. In the structure, Ser1412 of nNOS is positioned at the end of the C-terminal tail helix, which lies in a negatively charged groove at the surface of the reductase module. At the end of the C-terminal α -helix of nNOS, the phosphorylatable O- γ atom of Ser1412 is directed toward negatively charged FMN-binding domain residues Glu916 (Gln in eNOS) and conserved Asp918. This structure thus suggests a mechanism for phosphorylation-induced NOS activation by electrostatically induced conformational changes. The negative charge introduced by the phosphate group or the Ser1412Asp mutation, to mimic the phosphoserine, would repel both the partial negative charge of the α -helix dipole and the nearby conserved negatively charged residues. Thus, Ser1412 phosphorylation would destabilize and displace the regulatory C-terminal tail to relieve repression of •NO synthesis. Hence, phosphorylation of nNOS at Ser1412 activates electron transfer from the reductase domain towards the oxygenase domain of nNOS thus augmenting •NO synthesis and cGMP formation. This structure-based interpretation provides an attractive molecular mechanism whereby phosphorylation of a single residue induces large conformational changes that de-repress NOS.

Protein Kinase D (PKD) has been shown to play multiple roles in different cell types and tissues, from primary cellular functions such as the control of Golgi organization, protein traffic and secretion, adhesion and migration, proliferation, survival and death, to complex processes such as immune regulation, cardiac hypertrophy, angiogenesis and cancer. In addition, in nervous cells PKD1 has been involved recently in several neuronal functions like axon formation, sorting of dendritic proteins and dendritic arborization as well as in glutamate signaling through group I metabotropic receptors. There are three PKD isoforms (PKD1, PKD2 and PKD3) and constitute a family of phorbol ester/diacylglycerol-stimulated Ser/Thr kinases that belong to the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase superfamily. They contain several well-characterized and conserved common domains. First, at the N-terminus there are two cysteine rich regions that constitute a cysteine-rich domain (CRD). This domain binds diacylglycerol and phorbol esters with high affinity, and is involved in the association of PKD1 to cellular membranes. Next to it, we find a pleckstrin homology domain (PH) that is autoinhibitory and regulates the activity of this kinase, followed by the catalytic domain at the C-terminus. At the very C-terminal end of PKD1 and PKD2, absent in PKD3, there is a unique distinctive motif that constitutes a type I PDZ-binding sequence or PDZ-ligand (-VSIL in PKD1 and -ISVL in PKD2). Kinase activation by upstream effectors (such as protein kinase C) results in PKD1 autophosphorylation at Ser916 located at the protein carboxy-terminus and the appearance of a negative charge at this position. In PKD1 protein substrates a hydrophobic residue such as Leu/Val/Ile is typically present at position (-5), together with a basic residue such as Lys or Arg at position (-3), referred to the phosphorylatable Ser residue. However, some substrates partially fail to fully meet this requirement: the carboxy-terminus of PKD1/PKD2 presents an acidic Glu residue at the (-3) position.

Angiogenesis, the formation of new blood capillaries, is an important component of embryonic vascular development, wound healing, and organ regeneration, as well as pathological processes such as diabetic retinopathies, atherosclerosis, and tumor growth. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is

essential for many angiogenic processes both in normal and pathological conditions.

The common goal of the first part of the thesis was to analyze the role of the C-terminal tail of NOSs in the regulation of •NO synthesis.

1. We first started to work with the endothelial NOS. After reading two articles we suspected eNOS could be a substrate for PKD. The one of Wong et al. in which the results presented demonstrated that VEGF rapidly induces activation of PKD via the VEGFR2/PLC γ /PKC α pathway and that PKD is involved in VEGF-induced ERK signaling and endothelial cell proliferation. In addition, Hao et al. described that PKD2 plays a pivotal role in endothelial cell proliferation and migration necessary for angiogenesis at least in part through modulation of the expression of VEGFR2 y FGFR1, two key growth factor receptors involved in angiogenesis. When endothelial cell lysate was subjected to Western blotting with phospho-Ser/Thr PKD substrate antibody they found several protein bands, one of them had a molecular weight of 130 kDa. These two findings made us suspect that eNOS was that phosphorylated band in endothelial cells, so PKD could be a new kinase that also regulates eNOS activity and •NO synthesis. Therefore, the role of PKD in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis could be mediated by the activation of eNOS by PKD.

Our main objectives concerning to eNOS were:

- Examine if eNOS was a novel substrate for PKD both *in vivo* and *in vitro*, and that being the case, study the role of this phosphorylation.
- Analyze if there was a physical interaction between eNOS and PKD and determine the domains involved in that association.
- Examine the effect of VEGF or PDBu treatment in endothelial cells in terms of eNOS phosphorylation and activation by PKD, and subcellular location.
- Analyze the role of PKD in migration of BAEC cells in a wound healing assay and the effect of PKD inhibitors.

Our results demonstrate that both *in vitro* and *in vivo*, eNOS becomes phosphorylated by PKD in the activatory Ser1179 and this stimulates •NO production. Purified reductase domain of eNOS was phosphorylated by purified active catalytic domain of PKD1 in an *in vitro* kinase assay. After reaction completion, the sample was completely digested with trypsin and the resulting peptides analyzed by HPLC coupled to MALDI-TOF/TOF. Fragmentation of the precursor revealed unambiguously that Ser1179 was the phosphorylation site. eNOS phosphorylation by PKD at Ser1179 was confirmed by immunoblot using a phospho-specific antibody recognizing that position. It must be mentioned that this is an atypical site for PKD phosphorylation, as eNOS displays Arg residues at both positions (-5) and (-3). This phosphorylation also takes place *in vivo*, as it has been demonstrated in transfection assays with HEK293T cells or bovine aortic endothelial cells (BAEC), and it stimulates •NO synthesis. As a read out of •NO production we determine the signal of a fluorescent •NO sensor DAF2-DA and the levels of VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) phosphorylated on Ser239, which has been suggested to represent a biochemical marker of •NO levels in intact cells. Our studies also show that PKD forms of a complex with eNOS, and the association of eNOS and PKD depends on the NADPH eNOS domain, but not on its C-terminal tail. We have also identified that cellular stimuli such as VEGF induce eNOS phosphorylation on Ser1179 by PKD in endothelial cells, and so does the phorbol ester PDBu, a potent activator of PKD. We also examined the role of PKD in endothelial cell migration, an important step in angiogenesis. The migration of BAEC induced by VEGF or PDBu, with or without selective PKD inhibitors, was determined using a wound healing assay. Our results demonstrate that PKD inhibition markedly decreases the migration of BAEC cells, and we postulate that the mechanism by which PKD inhibition causes these effects might be, at least in part, through the inhibition of the eNOS phosphorylation and activation.

These findings establish a novel mechanism of regulation of •NO synthesis by PKD in the cardiovascular system.

2. The PDZ domain of nNOS is known to bind to PDZ2 of PSD-95 hence resulting in its translocation to the post-synaptic density in the proximity of NMDARs. In neurons both nNOS and PKD1/2 become associated to the NMDAR by means of interactions mediated by PDZ domains. Furthermore, PKD1 C-

terminus constitutes a PDZ-ligand that upon activation and autophosphorylation on Ser916 could mimic an acidic residue, hampering the interaction of PDZ-domains able to interact with the non-phosphorylated type I PDZ-binding motif. However, this change could favor the interaction of active PKD1 with other PDZ domains showing different affinities or properties, such as the one present in nNOS. With that in mind, we anticipated that the phosphorylated PDZ-ligand of active PKD1 could be a bona-fide binding partner for the PDZ domain of nNOS. Hence, we wondered if, in neurons, there could be a direct interaction between active PKD1 and nNOS mediated by their respective PDZ-ligand and PDZ domain and if the proximity of nNOS and PKD1 might result in a direct regulation of •NO synthesis through PKD1 activity, being nNOS a substrate for PKD1.

Our main objectives concerning to nNOS were:

- Examine if nNOS was a novel substrate for PKD both *in vivo* and *in vitro*, and that being the case, study the role of this phosphorylation.
- Analyze if there was a physical interaction between nNOS and PKD and determine the domains involved in that association.
- Examine the effect of PDBu treatment in HEK293T cells or PC12 cells in terms of subcellular location of transfected nNOS and PKD.

The studies shown herein describe that nNOS binds to and becomes phosphorylated in the activatory Ser1412 by PKD both *in vitro* and *in vivo*. It has been demonstrated by *in vitro* kinase assay using purified recombinant full-length nNOS and the active catalytic domain of PKD1 followed by mass spectrometry analysis of tryptic peptides, and the phospho-site was confirmed by immunoblot using a phospho-specific antibody recognizing that position. Our studies also show that PKD1 activation and autophosphorylation enhances the formation of a complex with nNOS and that the pleckstrin homology domain of PKD1 is important for this interaction, so the association of nNOS and PKD depends both on the PH domain and the activity of the kinase, but not on its PDZ-ligand. Activation of PKD enhances the formation of a heterodimeric complex hence establishing a novel mechanism of regulation of •NO synthesis in the nervous system. nNOS is the first PKD substrate which association with PKD1 is clearly enhanced after activation of the kinase. Phosphorylation of nNOS by PKD1 is a novel stimulatory mechanism for •NO biosynthesis and downstream cGMP/PKG signaling, as it has been confirmed by using the fluorescent •NO sensor DAF2-DA and the biochemical marker of •NO levels in intact cells, VASP-phospho-Ser239. This study discovers a novel biological relevant role of PKD1 in the regulation of nNOS activity and •NO synthesis, and opens the perspective of PKD being involved in the control of physiological and pathological processes where this mediator is involved.

Therefore, it could be feasible that PKD might be a general/common regulator of the enzymatic activity of constitutive NOS isoforms and •NO synthesis. In conclusion, our discoveries open new perspectives in the regulation of NOS enzymes and •NO production by active PKD. In addition, these novel findings add to the list of biological relevant roles of PKD a crucial one in the regulation of •NO synthesis and the plethora of physiological and pathological processes where this mediator is involved.

3. iNOS doesn't present a phosphorylatable Ser on its C-terminal tail that is also limiting the flow of electrons; however its carboxy-terminal amino acids display a type I consensus binding sequence toward proteins containing PDZ domains proteins that belong to NHERF (*Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factors*) family. To go in depth of the role of the tail of iNOS we focused on these two objectives:

- To clone, express and purify wild-type and three C-terminal truncated mutants ($\Delta 5$, $\Delta 10$, $\Delta 15$) of the complete iNOS or the reductase domain, and analyze and compare their enzymatic activity in terms of reductase and/or nitric oxide synthase activity, and the rate of flavin reoxidation.
- To clone, express and purify two NHERF proteins, EBP50 and CAP70 and analyze the effect of binding to both recombinant isoforms of wild-type iNOS in terms of reductase and/or nitric oxide synthase activity, and the rate of flavin reoxidation.

The progressive deletion of at least 10 amino acids increased their activity. In a more physiological approach, binding of purified recombinant EBP50 and CAP70 to both recombinant isoforms of iNOS increases significantly the cytochrome c reductase and •NO-synthesizing activity.

This is indicative that, as in the case of cNOS, the C-terminal stretch of amino acids regulates the activity of the enzyme limiting the flow of electrons from the reductase domain of the protein toward the heme-oxygenase domain.

The second part of the thesis was focused on the insect nuclear receptor E75. Nuclear receptors, the largest superfamily of transcription factors, are ligand-regulated polypeptides that share common domain architecture. Binding of small molecules to the ligand binding domain (LBD) of nuclear receptors modulates their association to specific DNA motifs. In insects, the early-induced gene E75 has been implicated genetically in repression of several genes in the ecdysone-triggered cascade and it is well-established that E75 also acts as a repressor in transient transfection assays. Heterodimerization of E75 with HR3 is known to block their ability to activate transcription. Interestingly, the *Drosophila melanogaster* E75 nuclear receptor, and more specifically its LBD, is a protein module that binds heme and diatomic gases such as •NO and CO. Full-length *D. melanogaster* E75 is isolated as a heme-bound ferric hemoprotein when obtained from the insect pupae and its isolated LBD is also a hemoprotein when recombinantly expressed and purified from both bacteria and baculovirus-infected cells.

From a functional point of view, coordination of diatomic gases to the heme moiety of *D. melanogaster* E75 induces a conformational change that interferes with its interaction with HR3 nuclear receptor, discontinuing repression of its transcriptional activity. Binding of •NO to *D. melanogaster* E75 displaces the Cys and His axial ligands rendering a pentacoordinate Fe(II)NO hemoprotein and justifying the observation that •NO functions as an antagonist of E75 repressor activity.

In eukaryotes, the only •NO sensor characterized in depth is the soluble guanylate cyclase, a hemoprotein that synthesizes cGMP. Obviously, the recent find that insect E75 are nuclear receptors that sense nitric oxide really attracted our attention. In addition, the fact that recent experiments have shown that their human homologues, Rev-erba and Rev-erbβ, are also heme and diatomic gases sensors, shows the key role of this protein family.

With the goal of cristalize the E75 LBD *Drosophila melanogaster* and *Oncopeltus fasciatus* during a short stay on Dr. Ortiz de Montellano's lab, we started working with them. Once we got the cDNA, we cloned, expressed and purified them, and the initial spectroscopic characterization showed us that there were essential differences that deserved being explored. Thus, we also decided to characterize two new orthologs, those from *Bombyx mori* and *Blattella germanica*, to compare their spectroscopic properties in the presence or absence of gases.

Our main objectives were:

- To characterize the spectral properties of E75 LBD from those four different insects and their response to diatomic gases.
- To characterize the covalent attachment of heme to protein moiety observed in *O. fasciatus* and *B. germanica* but absent in the orthologs from *D. melanogaster* and *B. mori*.

For those purposes, we have recombinantly expressed and purified LBDs of four insect nuclear receptors of the E75 family. The *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori* nuclear receptors were purified as ferric heme proteins with Soret maxima at 424 nm, whereas their ferrous form had a Soret maximum at 425 nm that responds to •NO and CO binding. In contrast, the purified LBD of *Oncopeltus fasciatus* displayed a Soret maximum at 415 nm for the ferric protein that shifted to 425 nm in its ferrous state. Binding of •NO to the heme moiety of *D. melanogaster* and *B. mori* E75 LBD resulted in the appearance of a peak at 385 nm, whereas this peak appeared at 416 nm in the case of the *O. fasciatus* hemoprotein, resembling the behaviour displayed by its human homolog Rev-erbβ. HPLC analysis revealed that, unlike the *D. melanogaster* and *B. mori* counterparts, the heme group of *O. fasciatus* is covalently attached to the protein through the side-chains of two amino acids. The large sequence homology with *O. fasciatus* E75 led us to clone and express the LBD of *Blattella germanica*, which established that its spectral properties closely resemble those of *O. fasciatus* and that it also has the heme group covalently bound to the protein.

Hence, •NO/CO regulation of the transcriptional activity of these nuclear receptors might be differently controlled among various insect species.

In addition, covalent heme binding provides strong evidence that at least some of these nuclear receptors function as diatomic gas sensors rather than heme sensors.

Finally, our findings expand the classes of hemoproteins in which the heme group is normally covalently attached to the polypeptide chain.



BLOQUE I

**Papel del módulo carboxi-
terminal de las Óxido Nítrico
Sintasas en la regulación de
la síntesis de $\bullet\text{NO}$**



INTRODUCCIÓN

1. El Óxido Nítrico.

El óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) es una molécula de señalización biológica crucial en numerosos eventos celulares ya que, además de estar implicada en el control de la fisiología de los sistemas cardiovascular, nervioso e inmune, actúa como un importante regulador de la expresión de ciertos genes y de la función mitocondrial (Forstermann y Sessa, 2012; Moncada y Higgs, 1993). El $\bullet\text{NO}$ controla numerosos procesos fisiológicos, tales como la neurotransmisión (Odell et al., 1991; Schuman y Madison, 1991), el tono vascular (a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble) (Forstermann et al., 1986; Rapoport et al., 1983), la transcripción de genes (Gudi et al., 1999; Khan et al., 1996), la traducción de mRNA (por ejemplo mediante la unión a IREs (*Iron-Responsive Elements*) (Liu et al., 2002; Pantopoulos y Hentze, 1995) y produce modificaciones postraduccionales de proteínas (Brune et al., 1994; Pozdnyakov et al., 1993). Dado que el $\bullet\text{NO}$ no puede ser almacenado en las células, el que pueda llevar a cabo sus funciones depende de su síntesis *de novo*. *In vivo*, una familia de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintetas (NOSs) sintetizan el óxido nítrico. En humanos, se han caracterizado tres isoformas: las isoformas constitutivas NOS neuronal (nNOS o NOS1) y NOS endotelial (eNOS o NOS3) y la isoforma inducible (iNOS o NOS2), que se expresa fundamentalmente en células expuestas a endotoxinas y a diversas toxinas pro-inflamatorias (Knowles y Moncada, 1994; Masters, 1994; Nathan, 1997). Sin embargo, también se ha comprobado que, bajo ciertas condiciones fisiológicas, en algunos tejidos la iNOS se expresa de forma constitutiva y las otras dos isoformas se pueden inducir ante determinados estímulos, tales como las fuerzas de rozamiento hemodinámicas ("*shear stress*") o daños en el sistema nervioso (Guo et al., 1995).

Los mecanismos de actuación del óxido nítrico mejor caracterizados son la activación de la guanilato ciclasa soluble, su efecto sobre la cadena respiratoria mitocondrial y la nitrosilación directa de proteínas (Hare, 2003). Por ejemplo, el aumento de los niveles de $\bullet\text{NO}$ en las células del músculo liso de las arterias tiene como consecuencia su unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble desplazando un residuo de histidina del lado distal, lo cual conduce a su activación. La elevación de la concentración de cGMP inicia una cascada de señalización, que finalmente conduce a la regulación de la actividad de numerosas quinasas y a la transcripción de diversos genes (Senzaki et al., 2001). Así, el aumento de los niveles de cGMP da lugar a la activación de una cascada de señalización mediada por la Proteína Quinasa G (PKG), comenzando con la fosforilación de proteínas reguladoras de las concentraciones intracelulares de calcio, proteínas del citoesqueleto y la cadena ligera regulatoria de la miosina de músculo liso.

Por otro lado, a concentraciones fisiológicas, el $\bullet\text{NO}$ inhibe la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (complejo IV) compitiendo con el O_2 . Esta interacción pone de manifiesto que la acción del $\bullet\text{NO}$ sobre la mitocondria es capaz de dar lugar a un fenómeno llamado "hipoxia metabólica" en la cual, existiendo una concentración normal de O_2 , la célula es incapaz de utilizarlo (Xu et al., 2005). Además, el

•NO puede tener un efecto de modificación postraducciona sobre diversas proteínas. Entre estas modificaciones cabe destacar la S-nitrosilación de residuos de cisteína, que afecta drásticamente a la función de las proteínas (Stamler et al., 2001). Un ejemplo de proteínas que se nitrosilan son las caspasas, cuya S-nitrosilación viene acompañada de la inhibición de la apoptosis (Li et al., 1997; Rossig et al., 2000; Tennesi et al., 1997). Finalmente, el •NO puede formar enlaces de coordinación con el átomo de hierro de las hemoproteínas, como es el caso de la hemoglobina (Rogers et al., 2005) o la guanilato ciclasa, mencionado anteriormente (Stone y Marletta, 1994). Tal y como se tratará en el segundo bloque de esta tesis, también existen receptores nucleares que son hemoproteínas en los que el •NO funciona como ligando.

Un modo importante de inactivación del •NO tiene lugar cuando reacciona con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formándose peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante. Este compuesto puede causar daño oxidativo, nitración y S-nitrosilación de biomoléculas, tanto proteínas como lípidos y DNA (Lee et al., 2003; Mikkelsen y Wardman, 2003). El estrés nitrosativo por $ONOO^-$ se ha implicado en daño en el DNA, seguido de activación de PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*) (Ridnour et al., 2004). Por lo tanto, debido a su potente reactividad química y a su alta difusibilidad, la producción de •NO está bajo un complejo y riguroso control para dictar la especificidad de su señalización y limitar la toxicidad a otros componentes celulares.

2. Las Óxido Nítrico Sintetas.

Las NOSs son enzimas homodiméricas constituidas por dominios de plegamiento independiente unidos por un polipéptido que contiene una secuencia de unión a calmodulina. Si bien poseen claras diferencias en sus extremos N- y C-terminales, el núcleo catalítico lo constituyen estos dos dominios (Figura 1).

El dominio hemo-oxigenasa corresponde aproximadamente a la mitad amino terminal de la proteína. Posee un sitio de unión para el sustrato L-Arginina (L-Arg), que se coloca sobre el grupo hemo (Fe protoporfirina IX) y para el cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH_4). Este dominio, es funcionalmente similar a los citocromos de la familia P450, en tanto en cuanto realiza reacciones de monooxigenación y presenta una cisteína que ejerce de ligando axial del Fe del grupo hemo en su forma de tiolato. Sin embargo, no existe homología entre el dominio hemo-oxigenasa de las NOSs y los citocromos P450, siendo además su plegamiento radicalmente diferente. La unión de L-Arg y BH_4 en el entorno del grupo hemo causa alteraciones en el campo electrónico en torno al átomo de hierro, que tienen su reflejo en una transición de bajo spin a alto espín en el espectro de UV/visible (Marletta, 1994; Rodríguez-Crespo et al., 1997; Stuehr, 1997). En la región más N-terminal de este dominio existe un grupo zinc-tiolato estructural, formado por un átomo de zinc coordinado en conformación tetraédrica con los grupos tiol (-SH) de dos pares de cisteínas, localizadas simétricamente en la interfase del dímero

(Crane et al., 1999; Fischmann et al., 1999; Raman et al., 1998). Mutaciones en estas cuatro cisteínas, dan lugar a una enzima incapaz de unir Zn, BH₄ y L-Arg, con lo que se inhibe la síntesis de •NO, lo que sugiere que el grupo zinc-tiolato es fundamental para la estabilidad de la interfase del dímero y como consecuencia, para la actividad enzimática de las NOSs (Hemmens et al., 2000; Miller et al., 1999b; Raman et al., 1998; Scheele et al., 2001). El dominio reductasa, que se corresponde aproximadamente con la mitad C-terminal de la enzima, posee sitios de unión para el sustrato NADPH (donador de electrones) así como para los cofactores FMN y FAD. Este dominio presenta homología de secuencia con la NADPH-citocromo P450 reductasa (CYPOR).

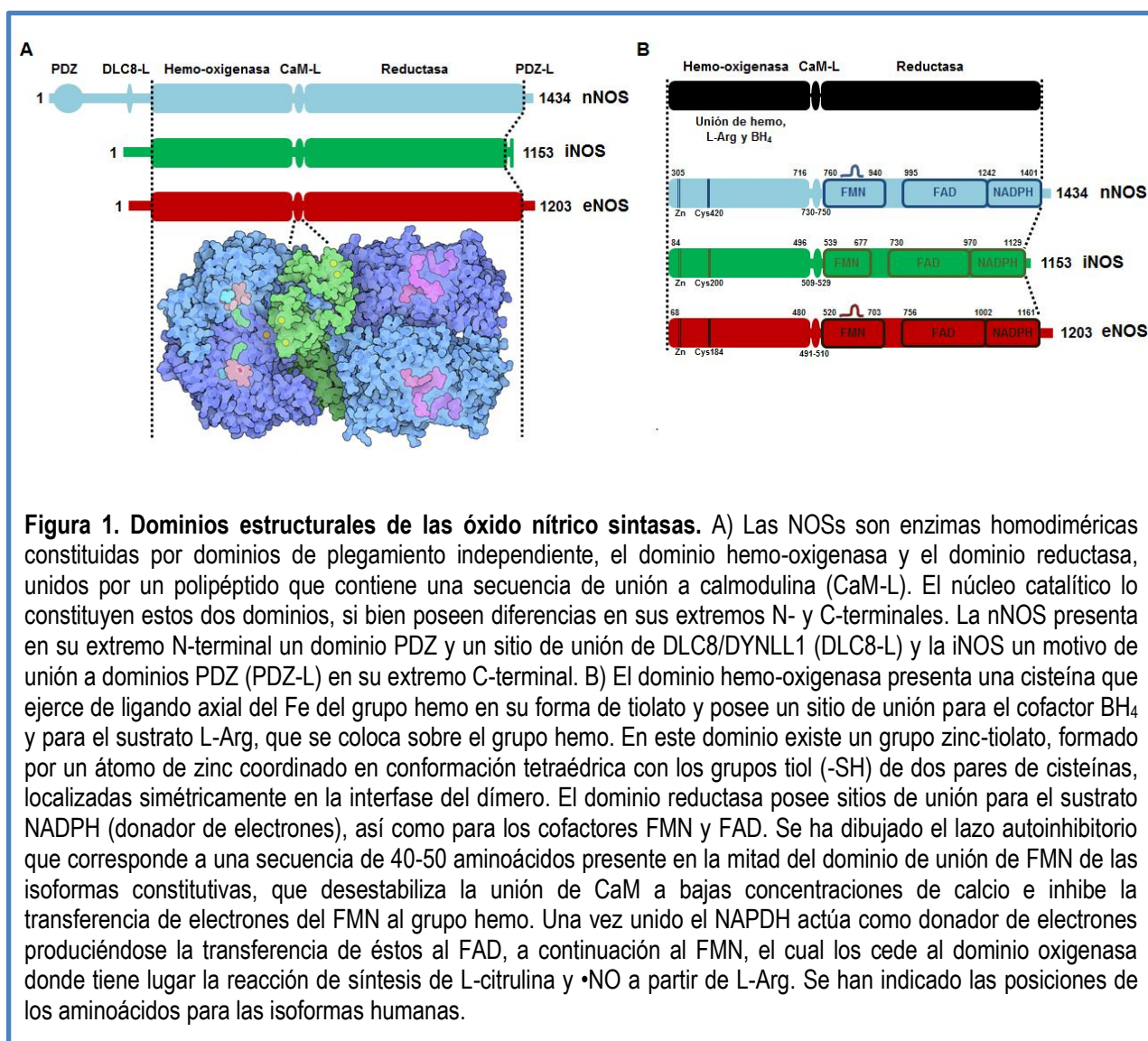


Figura 1. Dominios estructurales de las óxido nítrico sintasas. A) Las NOSs son enzimas homodiméricas constituidas por dominios de plegamiento independiente, el dominio hemo-oxigenasa y el dominio reductasa, unidos por un polipéptido que contiene una secuencia de unión a calmodulina (CaM-L). El núcleo catalítico lo constituyen estos dos dominios, si bien poseen diferencias en sus extremos N- y C-terminales. La nNOS presenta en su extremo N-terminal un dominio PDZ y un sitio de unión de DLC8/DYNLL1 (DLC8-L) y la iNOS un motivo de unión a dominios PDZ (PDZ-L) en su extremo C-terminal. B) El dominio hemo-oxigenasa presenta una cisteína que ejerce de ligando axial del Fe del grupo hemo en su forma de tiolato y posee un sitio de unión para el cofactor BH₄ y para el sustrato L-Arg, que se coloca sobre el grupo hemo. En este dominio existe un grupo zinc-tiolato, formado por un átomo de zinc coordinado en conformación tetraédrica con los grupos tiol (-SH) de dos pares de cisteínas, localizadas simétricamente en la interfase del dímero. El dominio reductasa posee sitios de unión para el sustrato NADPH (donador de electrones), así como para los cofactores FMN y FAD. Se ha dibujado el lazo autoinhibitorio que corresponde a una secuencia de 40-50 aminoácidos presente en la mitad del dominio de unión de FMN de las isoformas constitutivas, que desestabiliza la unión de CaM a bajas concentraciones de calcio e inhibe la transferencia de electrones del FMN al grupo hemo. Una vez unido el NADPH actúa como donador de electrones produciéndose la transferencia de éstos al FAD, a continuación al FMN, el cual los cede al dominio oxigenasa donde tiene lugar la reacción de síntesis de L-citrulina y •NO a partir de L-Arg. Se han indicado las posiciones de los aminoácidos para las isoformas humanas.

Las tres Óxido Nítrico Sintetas, a pesar de diferenciarse en tamaño (de 130 a 160 kDa) presentan homología de secuencia, con aproximadamente un 55% de identidad, siendo aún mayor en las regiones implicadas en la catálisis. Las diferentes isoformas presentan propiedades bioquímicas comunes y un esquema catalítico similar. Empleando O₂ y NADPH como cosustratos, catalizan la oxidación de la L-Arg para generar L-citrulina y •NO, a través del intermediario N-hidroxi-L-Arginina (NOHA) (Marletta, 1994).

Esta reacción compleja que requiere la participación de cofactores redox (el grupo hemo, BH_4 y las flavinas FAD y FMN), un átomo de Zn tetracoordinado estructural y la unión de Ca^{2+} /calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). La reacción transcurre mediante dos etapas de monooxigenación consecutivas tipo citocromo P450, en las que se lleva a cabo una oxidación en la que intervienen 5 electrones (Figura 2).

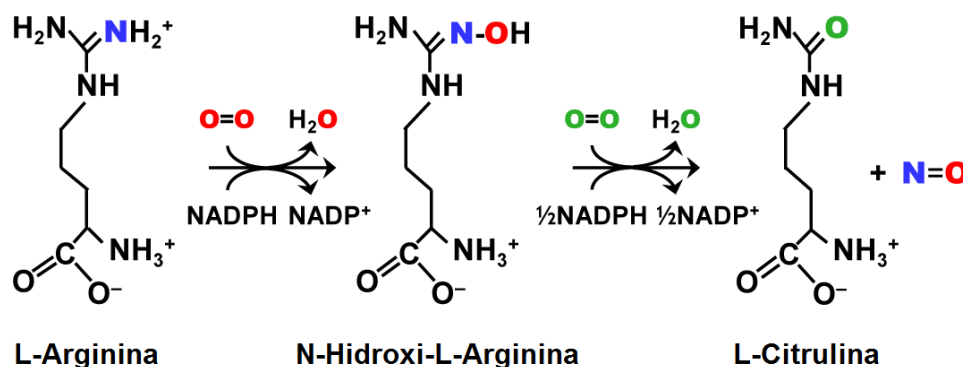


Figura 2. Síntesis de óxido nítrico por las NOS. Las NOS sintetizan óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) empleando como sustrato L-Arginina y como cosustratos O_2 y NADPH. En la primera etapa de la reacción, una molécula de O_2 y dos electrones del NADPH son consumidos para la conversión de L-Arg en N-hidroxi-L-Arginina (NOHA). En la segunda etapa, otra molécula de O_2 y un electrón adicional del NADPH son necesarios para convertir NOHA en L-citrulina y $\bullet\text{NO}$. Figura adaptada de (Sabat et al., 2013).

En eucariotas, las enzimas que contienen flavinas catalizan un amplio espectro de reacciones bioquímicas, tales como reacciones oxidasa, deshidrogenasa y monooxigenasa. La mayoría de las flavoproteínas contienen o bien FMN o FAD como grupos prostéticos; sin embargo pocas contienen ambos cofactores. En mamíferos, CYPOR fue la primera de estas enzimas que se aisló y caracterizó (Dignam y Strobel, 1975; Yasukochi y Masters, 1976), si bien posteriormente se han descrito otras 5 enzimas con dos flavinas: las tres óxido nítrico sintasas (Bredt et al., 1991; Schmidt et al., 1992), Metionina Sintasa Reductasa (MetSRed) (Leclerc et al., 1998) y NR1 (*Novel Reductase 1*) (Paine et al., 2000). La metionina sintasa es una enzima clave en el ciclo de metionina y cataliza la transmetilación de homocisteína a metionina en una reacción dependiente de cobalamina que emplea metiltetrahidrofolato como donador de grupo metilo (Banerjee et al., 1997). Por otro lado, la metionina sintasa reductasa es una flavoproteína dual cuya actividad es suficiente para mantener la actividad metionina sintasa en presencia de NADPH (Olteanu y Banerjee, 2001). La reductasa NR1 también une FMN, FAD y NADPH. Esta enzima se expresa de forma abundante en diversas líneas de células cancerosas humanas y por ello se piensa que pueda desempeñar un papel importante en la activación (o desactivación) de fármacos empleados en terapia de cáncer, activados mediante reducción por un electrón (Paine et al., 2000).

CYPOR, la más caracterizada de estas enzimas, se encuentra en el retículo endoplásmico de la mayoría de las células eucariotas y es un componente del sistema monooxigenasa de transferencia de electrones desde el NADPH a los citocromos P450 vía los cofactores FAD y FMN. En CYPOR, el NADPH transfiere dos electrones en la forma de ion hidruro al FAD, seguido de la transferencia de un solo

electrón al mismo tiempo al FMN, produciéndose el FMNH₂, que sirve como donador para el aceptor proteico (McLean et al., 2007). CYPOR también puede donar electrones a hemo-oxigenasa (Schacter et al., 1972), al citocromo *b*₅, al sistema de elongación de ácidos grasos (Ilan et al., 1981) y puede reducir al citocromo *c* (Williams y Kamin, 1962). La región N-terminal de CYPOR comparte una llamativa homología en la secuencia de aminoácidos con las flavodoxinas que contienen FMN, mientras que la región C-terminal muestra similitudes con las ferredoxina-NADP⁺ reductasas que contienen FAD, lo que llevó a proponer que CYPOR evolucionó a partir de la fusión de estas dos proteínas ancestrales (Porter, 1991).

En las NOSs el FAD y el FMN en el dominio reductasa aceptan electrones del NADPH y los transfieren al dominio hemo-oxigenasa. El dominio C-terminal es homólogo y funcionalmente similar a CYPOR, si bien en las NOSs en la mitad N-terminal está presente un dominio hemo-oxigenasa, de modo que los electrones del NADPH son transferidos desde el dominio reductasa de la NOS al centro activo, que es donde el O₂ y la L-Arg se transforman en •NO y L-citrulina. Así, el papel del dominio reductasa puede equipararse al de CYPOR, que dona electrones a las enzimas de la familia de los citocromos P450. El papel fundamental de los cofactores flavina es permitir que un donador de dos electrones como es el NADPH, done electrones a un aceptor de un solo electrón, el hemo, a través de la formación de intermedios radicales semiquinona estables. En todas estas diflavina-reductasas los electrones fluyen en dirección NADPH→FAD→FMN y este flujo es posible gracias a que los potenciales redox están equilibrados termodinámicamente. Se ha sugerido que el flujo de electrones entre las dos flavinas es el punto de control donde actúa la CaM ya que la transferencia de electrones desde el FAD al FMN es más lento en ausencia de Ca²⁺/CaM (Matsuda y Iyanagi, 1999). El efecto de la unión de la CaM es cinético más que termodinámico ya que la unión de Ca²⁺/CaM no tiene apenas efecto en los potenciales redox de las flavinas (Noble et al., 1999). Hay que destacar que la transferencia electrónica ocurre en *trans*, es decir, el dominio FMN de una cadena polipeptídica dona su electrón al dominio hemo de la otra (Siddhanta et al., 1996), una de las principales razones por la que el monómero es inactivo. Por otro lado, se sabe que la unión del sustrato L-Arg y del cofactor BH₄ promueve la dimerización ya que ambos se unen cerca de la interfase entre monómeros.

Inmediatamente después de su purificación de forma recombinante en bacterias, las NOSs se encuentran en estado férrico. En el caso concreto de la iNOS, la proteína purificada está en bajo espín con un potencial redox de -347 mV (Presta et al., 1998). La unión del sustrato (L-Arg) aumenta este potencial a -235 mV. Aunque aparentemente este aumento es similar al efecto que ejerce la unión del sustrato en los citocromos P450, esta forma de la enzima con arginina unida es inactiva ya que no tiene unida BH₄. La adición de BH₄ a la enzima promueve la transición a alto espín con un potencial redox de -295 mV y la posterior adición de arginina aumenta el potencial redox a -263 mV. En la nNOS, la enzima con BH₄ unida tiene un potencial redox aún más positivo, de -257 mV, que aumenta ligeramente a -248 mV tras la posterior unión de arginina. Así pues, en ausencia de arginina el potencial redox del hemo de

la nNOS es más positivo que el de las flavinas en el dominio reductasa (-274 mV para FMN/FMN $^{\bullet}$). La nNOS está menos acoplada que el sistema P450 y es posible reducir el hierro incluso cuando no hay sustrato unido. Como consecuencia, es posible que este desacoplamiento ("*uncoupling*") produzca superóxido desde el centro activo. El descubrimiento de que *in vitro* la nNOS produce más superóxido que la iNOS es consecuente con el hecho de que el potencial redox del hemo de la nNOS es más positivo, tanto en ausencia como en presencia de BH₄.

Con el Proyecto Genoma Humano completado se puede afirmar que hay 57 genes y más de 59 pseudogenes clasificados en las 18 familias y 43 subfamilias de citocromos P450 identificados. Sin embargo, aunque todos ellos son monooxigenasas capaces de aceptar electrones de la citocromo P450 reductasa que llegan al grupo hemo de su centro activo, ninguno de ellos puede sintetizar •NO. Ello se debe a que a lo largo de la evolución, las NOSs han llegado a ser las únicas hemoproteínas que también requieren de una pterina como cofactor. La síntesis de •NO sólo tiene lugar cuando ésta se encuentra en su estado máximo de reducción (BH₄) (Stuehr, 1997), si bien, el poder reductor de la BH₄ no se consume pasando ésta a BH₂, tal y como ocurre en las aminoácido hidroxilasas. Las óxido nítrico sintasas en su estado activo requieren del cofactor redox BH₄ para la transformación de L-Arg en N-hidroxi-L-Arg y de N-hidroxi-L-Arg en L-citrulina si bien después de un ciclo catalítico la BH₄ vuelve a su estado reducido. Además, la presencia de BH₄ es fundamental para la estabilización de los homodímeros de NOSs (RodríguezCrespo et al., 1996).

La similitud de secuencia entre el dominio reductasa de las NOSs y CYPOR fue advertida por Bredt y Snyder (Bredt y Snyder, 1990) cuando llevaron a cabo la clonación de la primera óxido nítrico sintasa, la nNOS. Las posteriores clonaciones de la iNOS (Xie et al., 1992) y de la eNOS (Lamas et al., 1992a), revelaron que las tres isoformas de las NOSs de mamífero poseían, a continuación de su núcleo catalítico constituido por los dominios hemo-oxigenasa y reductasa, un módulo carboxi-terminal ausente CYPOR. La posterior clonación de las otras dos di-flavina reductasas dependientes de NADPH identificadas en mamíferos, NR1 y MetSRed, ha demostrado que tampoco estas dos enzimas poseen estas extensiones C-terminales (Figura 3). Tal y como se comentará a lo largo de la presente tesis doctoral, esta extensión C-terminal es determinante para regular la actividad de las tres isoformas, en el caso de la nNOS y eNOS a través de una fosforilación en un residuo de Ser específico, mientras que en el caso de la iNOS a través de su unión a proteínas con dominios PDZ (*Postsynaptic density-95/ Discs-large A/ Zonula occludens-1 homology*).

	CaM	FMN ▶	
NR1	-----MPSPQLLVLFSGSQTGTAQDVSERLGREARRRRLGCRVQALDSYPVVNL-----	INEPLVI	55
CYPOR	-----VEKMKKTGRNIIVFYGSQTGTAEFANRLSKDAHRYGMRGMSADPEEYDLADLSSLPEDNALVV		137
nNOS	KRRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQAMAKRVKATILYATETGKSQAYAKTLC-EIFKHAFDAKVMSMEYDIVHLE-----	HETLVL	808
eNOS	ITRKKTFKEVANAVKISASLMGTVMAKRVKATILYGSETGRAQSYAQQLG-RLFRKAFDPRVLCMDYDVVSLE-----	HETLVL	568
iNOS	KRREIPLKVLVKAVLFACMLMRKTMASRVVITILFATETGKSEALAWDLG-ALFSCAFNPKVVCMDKYRLSCLE-----	EERLLL	587
MetSRed	-----TVTCLEVMRRFLLLYATQQGQAKAIAEEMCEQAVVHGFSAADLHCISESDKYDLKT-----	ETAPLV	81

	Elemento autoinhibitorio (AH)	
NR1	FVCATTGQGDPPDNMKNFWRFI FRKNLPSTALCQ-----MDFAVLGLG	98
CYPOR	FCMATY GEGDPTDNAQDFYDWLQET---DVDLSG-----VKFAVFGLG	177
nNOS	VVTSTFGNGDPPENGEKFGCALMEMRHPNSVQ---EERKSYKVRFNSSVSSYSDSQKSSGDGPDRLDNFESAGPLANVRF SVFGLG	890
eNOS	VVTSTFGNGDPPENGEFSAALMEMSGPYNSSPRPEQHKSYKIRFNSISCSDDLVSRRKRKESSTNTDSAGALGTLRF CVFGLG	653
iNOS	VVTSTFGNGDCPGNGEKLKSLFMLKELNNKF-----RYAVFGLG	627
MetSRed	VVVSTTGTGDPDTARKEFVKETQNTLPVDFFAH-----LRYGLLGLG	124

	◀ FMN	
NR1	DSSYAKNFVAKKLHRRLLQLGGSALLPVCLGDDQHELGPDAVDWPLRDLWDRVLGLYPPPPGLTEIPPGVPLPSKF-----	176
CYPOR	NKTYEHFNAMGKYVDKRLQLGAQRIFELGLGDDDNLEEDFIT--WREQFWPAVCEHFG--VEATGEESSIRQYELV-----	251
nNOS	SNVHKRVSAARLLSRQLQSPKSSRSTIFVRLHTNGSQELQYQPGDHLGVFPGNHEDLVNALIERLEDAPPVNMVQVLELLE	966
eNOS	SRAYPHFCFAFAVADTRLEELGGERLLQLGQDELGCQEEAFRG--WAQAFAQACETFCVGEDA--KAAARDIFSPK-----	727
iNOS	SSMYPRCAFAHDIDQKLSHLGASQLTPMGEGDELSCQEDAFRS--WAVQTFKAACETFDVVRGKQ--HIQIPKLYTSN-----	701
MetSRed	DSEYTYFCNGGKIIDKRLQELGARHFYDTGHADDCVGLLELVPE--WIAGLWPALRKHFRRSSRQEEISGALPVASPASLRDTLV	207

NR1	-----TLLFLQEA PSTGSEG-----QVVAHPGSQE	201
CYPOR	-----VHTDIDA AKVYMGEM-----GRLKS YENQK	276
nNOS	-----RSWKRNKFR LTFVA-----EAPELTQGL	989
eNOS	-----RSWKRRQRYRLSAQA-----EGLQLLPGL	750
iNOS	-----VTWDPHHYRLVQDS-----QPLDL SKAL	724
MetSRed	KSELLHIESQVELLRFDDSGRKDSEVLKQNAVNSNQSNVVIEDFESSLTRSVPLSQASLNI PGLPPEYLQVHLQESLGQEE SQV	292

	FAD ▶	
NR1	PPSESK-PFLAPMISNRQVTPGSHFQDVRLIEFDILGS-GISFAAGDVVLIQPSNSAAHVQRFQVGLDQFLMQLPREPD--	282
CYPOR	PPFDKPNPFLAAVTNNRKLN-QGTERHLMHLELDISDS-KIRYESGDHVA VY PANDSALVNQLGKILGADLDVMSLNNLDEE--	357
nNOS	SNVHKRVSAARLLSRQLQSPKSSRSTIFVRLHTNGSQELQYQPGDHLGVFPGNHEDLVNALIERLEDAPPVNMVQVLELLE	1074
eNOS	IHVHRRKMFQATIRSVENLQSSKSTRATILVRLDTGGQEGLYQYQPGDHIGVCPNRPGLVEALLSRVEDPPAPTEPVAVEQLE-K	834
iNOS	SSMHAKNVFTMRLKSRQLQSPSTSRATILVELSCEDGQGLNLYLPGHGLGVCPGNQPALVQGILERVVDGPTPHQTVRLEALD--	807
MetSRed	SVTSADPVFQVPIKAVQLTTNDAIKTTLLVELDISNT-DFSYPGDAF SVICPNSDSEVQSLQLRQLQLEDKREHCVL LKIKADT	376

	CD2A	
NR1	-----VSSPTRLPPQCSMRHLVSHYLDIASVPRRSFFELLACL SLHELEREKLEFSSAQGQ--EELFEYCNRPRTTILEVL	357
CYPOR	-----SNKKHPFPCTPSYRTALTYLDITNPRTNVL YELAQYASEPSEQELLRKMASSSGEGKELYLSVVVEARRHILAIL	434
nNOS	NTALGVISNWTDELRLPPCTIFQAFKYLDITTPPTPLQLQQFASLATSEKEKQRLVLVLSKGLQYEEWKKWGN---PTI VEVL	1155
eNOS	GSPGGPPPGWVRDPRLPCTLRQALTFFLDITSPSPQLRLRLSTLAE EPREQQELEALSQDPRRYE EWKWFRC---PTLLEVL	915
iNOS	--ESG--SYWVSDKRLPPCSLSQALTYFLDITTPPTQLLLQKLAQVATEEPERQRL EALCQ-PSEYSKWKFTNS---PTFLEVL	883
MetSRed	K---KKGATLPQHIPAGCSLQFIFTWCLEIRAI PKAFLRALVDYTSDSA EKRRLQELCSKQGAADYSRFVRD--ACACLLDLL	455

NR1	CDFPHTAAAI PPDYLLDLPVIRPRAFSIASSLLTHPSRLQILVAVVQFQTRLKE--PRRGLCSSWLASLDPGQ-----	429
CYPOR	QDCP--SLRPPIDHLCELLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHICAVVEYETKAGR--INKGVATNWLRAKEPANG-----	507
nNOS	EEFP--SIQMPATLLLTQLSLLQPRYYSISSPDMYPDEVHLTVAVSYRTRDGEPIHHGVCSWLNRIQADE-----	1227
eNOS	EQFP--SVALPAPLLLTQLPPLQPRYYSVSSAPSTHPGEIHLTVAVLAYRTQDGLGPLHYGVCSWTLSQLKPGD-----	987
iNOS	EEFP--SLRV SAGFLLSQLPLKPRFYSISSSRDHTPTBIHLTVAVVYTHTRDQGQPLHHGVCSWTWLSLKPQD-----	955
MetSRed	LAFP--SCQPLSLLEHLPLKLPQRPYSCASSSLFHPGKLHFVFNIVEFLSTATTEVL RKGVC TGWLALLVASVLQPNIHASHED	538

	◀ FAD NADPH ▶	
NR1	----GPVRVPLWVR-PGSLAFPETPDTVMIMVPGTGVAFFRAAIQE-RVAQG-QTGN----FLFFGCRWRDQDFYWEAEWQEL	502
CYPOR	----GRALVPMFVR-KSQFRLPFKATTPVIMVPGTGVAFFIGFIE-RAWLR-QQKEVGETLLYYGCRRSDE DYLYREELAQF	585
nNOS	-----LVPCFVRGAPSFHLPRNPQVPCILVGP GTGIAPFRSFWQ-QQFDIQHKGMNCPMVLVFGCRQSKIDHIYREETLQA	1304
eNOS	-----PVPCFIRGAPSFRLPPDPSLPCILVGP GTGIAPFRGFWQE-RLHDIESKGLQPTPMTLVFGCRCSQLDHLRYDEVQNA	1064
iNOS	-----PVPCFVRNASGFHLPEDP SHPCILIGPGTGIAFFRSFWQ-RLHDSQHKGVRRGMTLVFGCRRPDEDH IYQEEMLEM	1032
MetSRed	SGKALAPKISISPRTTNSFHLPPDPSIPIIMVGP GTGIAPFIFGLQHREKLQEQHPDGNFGAMWLF FGCRHKDRDYLF RKELRHF	623

NR1	EKRDCLT-LIPAFSR----EQEQ-KVYVQHRLR-ELGSLVWELLDRQGAFFYLAGNAKSM PADVSEALMSIFQEEGGLCSPDAA	579
CYPOR	HRDGALTQLNVAFSR----EQSH-KVYVQHLLK-QDREHLWKLIEG-GAH IYVCGDARNMARDVQNTFYD IVAELGAMEHAQAV	662
nNOS	KNKGVFRELYTAYSR----EPDKPKKYVDILQEQLAESVYRALKEQGGHIYVCGDVT-MAADV LKAIQRIMTQQGKLSAEDAG	1383
eNOS	QQRGVFGRVLTAFSR----EPDNPKTYVDILRLTELA AEVHRVCLERGHMFVCGDVT-MATNVLQTVQRILATEGDMELDEAG	1143
iNOS	AQKGVLHAVHTAYSR----LPGKPKVYVDILRQLQASEVLVVLHKEPGHLYVCGDVR-MARDVAHTLQQLVAAKLLNNEEQVE	1111
MetSRed	LKHGILTHLKVSRDAPVGE EAPAKYVDQNIQ-LHGQVVARILLQENGH IYVCGDAKNMAKD VHDALVQIISKEVGVEKLEAM	707

	◀ NADPH C-terminal	
NR1	AYLARLQQTTRFQTETWA-----	597
CYPOR	DYIKKLMTKGRYSLDVWS-----	680
nNOS	VFISMRDDNRYHEDI FGVTLRTYEV TNRLRSESI AFIEESKK-DTDEVFSS-----	1434
eNOS	DVIGVLRDQQRHYHEDI FGLTLRTQEVTSRIRTSFSLQERQLRGAVFWAFDPGSDTNSP	1203
iNOS	DYFQLKSQKRYHEDI FGA VFPYEAKKDRVAVQPSLSMSAL-----	1153
MetSRed	KTLATLKEEKRYLODIWS-----	725

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de las tres reductasas identificadas en mamíferos que unen NADPH y dos flavinas, NADPH-citocromo P450 reductasa (CYPOR), *Novel Reductase 1* (NR1), Metionina Sintasa Reductasa (MetSRed) junto con los dominios reductasa de las tres NOSs humanas. Se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias con el programa Clustal. Se ha indicado la región de unión de CaM en las NOSs, así como las regiones de unión de FMN, FAD y NADPH. En morado se han señalado los elementos reguladores inhibitorios, como el elemento autoinhibitorio (AH) presente en las isoformas constitutivas, el lazo CD2A (Knudsen et al., 2003) y las extensiones C-terminales. # y Δ indican respectivamente los residuos aromáticos implicados en la unión a los anillos de FMN y FAD. Los residuos que son fosforilados, como la Thr495 en la región de unión de CaM de la eNOS, la Ser presente en el lazo autoinhibitorio de las isoformas constitutivas, la Tyr1055 conservada que al menos en la iNOS es fosforilada por Src y la Ser presente en la extensión C-terminal de las isoformas constitutivas cuya fosforilación conlleva un aumento en la actividad de estas isoformas se han marcado en rojo y se han señalado mediante un asterisco. El dominio reductasa de las NOSs presenta gran homología de secuencia con la citocromo P450 reductasa, así como con las dos reductasas identificadas posteriormente; sin embargo, las tres NOSs de mamíferos poseen extensiones C-terminales ausentes en las otras tres proteínas.

Los estudios de actividad realizados con mutantes de delección recombinantes en los que se han eliminado los primeros 226 aminoácidos de la nNOS (Brenman et al., 1995), los primeros 52 aminoácidos de la eNOS (Rodríguez-Crespo et al., 1997) o los primeros 65 aminoácidos de la iNOS (Ghosh et al., 1997) muestran que el extremo amino terminal de las NOSs no está implicado en la síntesis de •NO ya que todos estos mutantes son activos. Sin embargo, *in vivo*, este extremo sí que parece jugar un papel importante en la localización subcelular de cada una de las isoformas, bien por interacción a través de dicho dominio con otras proteínas celulares, como es el caso de la nNOS, o bien por modificación postraducciona de mismo, como sucede en la eNOS y la iNOS.

Quizá la principal diferencia entre las tres isoformas de NOS se refiere a su proceso de activación. Mientras que las isoformas endotelial y neuronal necesitan un incremento en los niveles intracelulares de calcio para que se produzca la unión de Ca^{2+} /CaM, unión que además en su caso es reversible, la activación de la iNOS es independiente de Ca^{2+} gracias a que su gran afección por Ca^{2+} /CaM hace que la enzima sea activa a los niveles basales de Ca^{2+} intracelular. Durante muchos años se asumió que la regulación de la síntesis de •NO por parte de la iNOS ocurría de manera transcripcional (Cho et al., 1992; MacMicking et al., 1997). Hoy en día, se sabe que la palmitoilación N-terminal de la iNOS (Navarro-Lerida et al., 2006; Navarro-Lerida et al., 2004), su fosforilación por parte de la quinasa Src (Tyryshkin et al., 2010) o su asociación a proteínas con dominios PDZ a través de su extremo C-terminal (Glynne et al., 2002; Navarro-Lerida et al., 2007) también regulan no sólo su localización subcelular sino también su actividad enzimática.

Otra de las diferencias entre las tres isoformas tiene que ver con la fuerza de asociación de sus monómeros y la influencia de L-Arg y BH_4 sobre la formación y estabilidad de los mismos. Estudios con los dominios hemo-oxigenasa y reductasa aislados utilizando la técnica del doble híbrido de levadura indican que sólo el dominio hemo-oxigenasa está implicado en la formación de dímeros para la iNOS, mientras que la interacción entre los dominios hemo-oxigenasa, entre los dominios reductasa y entre los dominios reductasa y hemo-oxigenasa son críticos para la dimerización de la nNOS y de la eNOS (Venema et al., 1997).

Por otro lado, tal y como muestra la Figura 3, la longitud de esta extensión en el extremo C-terminal es de 42, 33 y 21 aminoácidos respectivamente para la eNOS bovina, la nNOS de rata y la iNOS de ratón y la tasa de síntesis de •NO por estas tres isoformas está inversamente relacionada con su longitud (Nishida y de Montellano, 2001). Estudios muy elegantes llevados a cabo por Bettie Sue Masters y colaboradores mostraron que la fusión de las extensiones C-terminales de cada una de las NOSs a CYPOR bloqueaban la transferencia de electrones (Jachymova et al., 2005). La medida de la reducción de citocromo c dependiente de NADPH reveló una inhibición creciente de la actividad de CYPOR según aumentaba la longitud de la cola C-terminal añadida.

Esta secuencia autoinhibitoria común a las tres isoformas se retuerce hacia atrás para interactuar con el dominio flavina e interferir en la interacción entre las dos flavinas con lo que se atenúa la transferencia de electrones de forma independiente de CaM (Roman et al., 2000a; Roman et al., 2000b). Los datos cristalográficos de la nNOS indican que esta extensión C-terminal adopta una conformación helicoidal (Garcin et al., 2004), que funciona a modo de “tapadera” del dominio reductasa que obstruye la adecuada transferencia de electrones (Adak et al., 2001; Tiso et al., 2005). Como veremos, las isoformas constitutivas poseen en esta extensión C-terminal un residuo de serina conservado donde converge la actividad de varias quinasas. En la eNOS la fosforilación en la posición Ser1177 (para la proteína humana) y en la nNOS la fosforilación del residuo equivalente (Ser1412 en la isoforma de rata), inhabilita este elemento de control y con ello aumenta el flujo de electrones hacia el dominio hemo-oxigenasa. Consecuentemente, la fosforilación aumenta la producción de •NO, que en el caso de la eNOS es de dos a tres veces superior a los niveles basales (Lane y Gross, 2002). El grupo fosfato en esta posición también aumenta la actividad de la nNOS, mientras que su desfosforilación por fosfatasas la disminuye (Rameau et al., 2007). El átomo de oxígeno fosforilable de la Ser1412 de la nNOS de rata está dirigido hacia los residuos Glu916 y Asp918 negativamente cargados del dominio FMN (Garcin et al., 2004). Se ha propuesto que esta disposición justifica el mecanismo por el que la fosforilación de las isoformas constitutivas induce la activación. Así, el cambio conformacional inducido electrostáticamente estaría mediado por la repulsión de la carga negativa del grupo fosfato incorporado. De esta forma, la fosforilación de la nNOS en la Ser1412 activa la transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio hemo-oxigenasa con lo que aumenta la síntesis de •NO y la consiguiente formación de cGMP (Rameau et al., 2007). En la isoforma inducible no existe un residuo equivalente que sea fosforilado; en su lugar, el extremo C-terminal constituye un motivo de unión a dominios PDZ de modo que la interacción con proteínas que contienen uno de estos dominios induce un cambio conformacional que conlleva a la retirada de la “tapadera”. Se han realizado delecciones carboxi-terminales en las isoformas constitutivas nNOS y eNOS (33 aminoácidos en la nNOS o 42 en la eNOS) y las proteínas recombinantes han sido purificadas y caracterizadas (Roman et al., 2000a). En ausencia de CaM, las isoformas truncadas de eNOS y nNOS fueron de 7 a 21 veces más activas, respectivamente, que las no truncadas. No obstante,

aunque las proteínas truncadas de nNOS y eNOS fueron capaces de sintetizar •NO en presencia de CaM, lo hicieron a tasas que eran respectivamente un 45 y un 33% de la de sus respectivas proteínas completas (Roman et al., 2000a). Estudios similares se han llevado a cabo con la isoforma inducible, que serán comentados más adelante.

Esta comparación entre secuencias de la Figura 3 también pone de relieve la existencia de bucles internos. El primero de estos bucles autoinhibitorios descritos, el elemento autoinhibitorio (AH), corresponde a una secuencia de 40-50 aminoácidos en la mitad del dominio de unión de FMN de las isoformas dependientes de Ca^{2+} que no está presente en la iNOS (Nishida y de Montellano, 1998; Salerno et al., 1997). Este inserto polipeptídico desestabiliza la unión de CaM a bajas concentraciones de calcio e inhibe la transferencia de electrones del FMN al grupo hemo. Por otro lado, se ha visto que péptidos sintéticos derivados de esta inserción de 45 aminoácidos de la eNOS, impiden potentemente la unión de CaM a las isoformas constitutivas disminuyendo la actividad enzimática (Salerno et al., 1997). Tal mecanismo de control implicaría que el inserto debe ser desplazado para facilitar la unión de CaM. La delección de esta región autorreguladora da lugar a una enzima con menor dependencia de CaM en lo que se refiere a su actividad reductasa y con menor sensibilidad a los niveles de Ca^{2+} (Chen y Wu, 2000; Daff et al., 1999; Montgomery et al., 2000; Nishida y de Montellano, 1999).

Existe un tercer elemento autoinhibitorio, el lazo CD2A, que se encuentra en el dominio conector cuya secuencia se encuentra inmersa en el fragmento polipeptídico que se pliega dando lugar al subdominio que une FAD. En la eNOS, la isoforma que presenta la transferencia de electrones más lenta y las tasas de actividad más bajas, este lazo es 5 aa más largo que en la iNOS. Este lazo puede establecer interacciones electrostáticas con el subdominio que une FMN o con la región de unión de CaM ya que al igual que el elemento autoinhibitorio (AH) está a una distancia de la región de unión de CaM que permite una interacción directa. El lazo CD2A junto con el elemento autoinhibitorio regulan de forma cooperativa la transferencia de electrones dentro de los dominios reductasa de las isoformas constitutivas pero su función autoinhibitoria se ve enmascarada por el elemento autoinhibitorio que es dominante. Las interacciones electrostáticas entre el lazo CD2A y la región de unión de CaM y la CaM en sí misma, proporcionan la justificación estructural por la que el elemento CD2A atenúa la actividad dependiente de CaM (Knudsen et al., 2003).

En definitiva, las tres isoformas de NOSs son enzimas complejas altamente reguladas y su actividad, y por tanto la producción de •NO por parte de cada una de ellas, está sujeta a una amplia variedad de controles transcripcionales, traduccionales y postraduccionales. Además del equilibrio de dimerización y la tasa de degradación, los principales mecanismos de modulación de las NOS son su localización subcelular (que limita tanto la disponibilidad de sustrato como su proximidad a proteínas, entre las que se encuentran los canales de calcio), fosforilación, acilación (miristoilación y palmitoilación) e interacción con otras proteínas. Todos estos mecanismos están interrelacionados, lo que conduce a un

complejo sistema de control para cada una de las isoformas de óxido nítrico sintasa que permite regular el tiempo, magnitud y distribución espacial de la liberación de •NO.

3. La Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS-NOS1).

La nNOS, descubierta por Bredt y Snyder (Bredt et al., 1991), es la isoforma más grande de las tres, con 1434 aminoácidos en el caso de la proteína humana y una masa molecular de 160,8 kDa. Su mayor tamaño se debe principalmente a una extensión N-terminal de unos 300 aminoácidos en la que está presente tanto un dominio PDZ (aa 14-105) como una secuencia polipeptídica que interacciona con la cadena ligera de dineína DLC8/DYNLL1 (*Dynein Light Chain 8*) (Bredt et al., 1991; Rodríguez-Crespo et al., 1998). Su actividad enzimática es dependiente de la unión de Ca^{2+} y CaM. Se expresa de forma constitutiva en neuronas específicas del cerebro, tanto en neuronas maduras como inmaduras (Chen et al., 2004; Jiang et al., 2004), donde se encuentra tanto en forma particulada como soluble (Hecker et al., 1994), y su diferente localización subcelular contribuye a sus diversas funciones (Zhou y Zhu, 2009). Mediante inmunohistoquímica, además de en cerebro, la nNOS se ha identificado en la médula espinal, en los ganglios simpáticos, glándulas adrenales, en nervios nitrérgicos periféricos, en células epiteliales de varios órganos, en células de la mácula densa en riñón, en células de islotes pancreáticos, en músculo liso vascular y en músculo cardíaco (Forstermann et al., 1994). En mamíferos, la fuente principal de nNOS en términos de masa tisular es el músculo esquelético (Forstermann et al., 1994; Nakane et al., 1993).

Los principales mecanismos de modulación de la actividad de la nNOS son la localización subcelular y diversos factores que regulan su función, como son la dimerización, la fosforilación, la unión de CaM, la interacción con otras proteínas (con dominios PDZ), inhibidores de la nNOS, Hsp90 (*Heat shock protein 90*) y caveolina-3. Por otro lado, puesto que el monómero de nNOS es inactivo, su dimerización y actividad viene determinada por los niveles celulares de BH_4 , hemo y L-Arg (Reif et al., 1999).

3.1. Dimerización de la nNOS.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la nNOS es activa en su forma dimérica, con una extensa interfase formada entre los dos dominios oxigenasa que crean sitios de unión de alta afinidad para BH_4 y L-Arg (Crane et al., 1998; Fischmann et al., 1999). La dimerización aumenta la actividad de la nNOS, ya que al crear estos sitios de unión de alta afinidad se facilita el flujo de electrones, y puesto que la transferencia de electrones ocurre de un monómero a otro (Siddhanta et al., 1996), un monómero aislado de nNOS no puede sintetizar •NO. En el caso de la nNOS, también se dan interacciones entre los dominios reductasa y hemo-oxigenasa y entre los dos dominios reductasa (Panda et al., 2003; Venema et al., 1997). Puesto que tanto el cofactor BH_4 , como el hemo y la L-Arg estabilizan el dímero (Kamada et al., 2005), moléculas que compiten con la L-Arg en el centro activo tales como el inhibidor 7-nitroindazol

reducen la afinidad de BH₄ y L-Arg y promueven la monomerización (Dunbar et al., 2004; Lajoix et al., 2004). Además, la estabilización del dímero protege a la nNOS de proteólisis y la desestabilización del dímero de nNOS le hace más susceptible de ser fosforilado por PKC (Proteína quinasa C) e hidrolizado por tripsina.

3.2. Localización subcelular de la nNOS.

De forma general, la localización subcelular de las NOSs viene determinada por motivos localizados en su extremo N-terminal. Tanto en neuronas como en células musculares, la síntesis de •NO aparece frecuentemente regulada por medio de la localización de la nNOS en regiones subcelulares específicas mediada por proteínas adaptadoras. En el caso de la nNOS, la asociación de su dominio PDZ con otras proteínas neuronales determina su enriquecimiento en las densidades post-sinápticas (Luo y Zhu; Zhou y Zhu, 2009). El dominio PDZ de la nNOS presenta cuatro formas diferentes de asociación a otras proteínas celulares (Doucet et al., 2012). Por un lado, mediante interacciones laterales PDZ/PDZ puede unirse a sintrofina o PSD-95 (*Postsynaptic density protein-95*). Por otro lado, a través de su dominio PDZ puede interaccionar directamente con extremos C-terminales ácidos (de CAPON (*Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*), por ejemplo) o con secuencias internas (Vac14). Finalmente, el dominio PDZ de la nNOS puede asociarse a la distrofina, de forma específica a sus repeticiones tipo espectrina R16 y R17, lo cual resulta en su translocación al sarcolemma de las células musculares (Lai et al., 2013). Todas estas interacciones determinan su distribución subcelular y/o la actividad de la enzima. De hecho, la nNOS se localiza en membranas a través de la unión con sintrofina, PSD-95 o PSD-93 (*Postsynaptic density protein-93*) (Brenman et al., 1996b).

De hecho, la diferente localización subcelular de la nNOS en neuronas, astrocitos o células musculares puede contribuir a sus diversas funciones. Por ejemplo, Rothe y colaboradores mostraron que en cerebro, la inmunorreactividad de la nNOS en neuronas se distribuía principalmente en el citosol lejos de las membranas, en forma de parche (Rothe et al., 1998). Durante los seis primeros días del cultivo de astrocitos corticales de cerebro de rata, la inmunorreactividad de la nNOS se encontraba principalmente en el citoplasma. Sin embargo, en el día 7 se encontró principalmente en el núcleo y esta localización nuclear tenía una duración de 10 horas. Después volvía al citoplasma. Más recientemente se ha visto en algunas partes de células neurales y gliales la localización nuclear de la nNOS, sin tinción en el citoplasma (Korzhevski et al., 2007).

3.3. Fosforilación de la nNOS.

La fosforilación de la nNOS es importante para su actividad. Su estado de fosforilación está regulado por diversas quinasas y fosfatasa, tales como PKA (*Cyclic AMP-dependent protein kinase* o Proteína quinasa A), CaMK (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*), PKC o la proteína fosfatasa 1, todas

ellas proteínas reguladas por diferentes factores intra y extracelulares. Sin embargo, la fosforilación en distintas posiciones afecta a la actividad de la nNOS de forma diferente. Así, CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) fosforila a la nNOS en la Ser847, lo que reduce la actividad al inhibir la unión de Ca^{2+} /CaM. La localización de la Ser847 dentro del lazo autoinhibitorio conlleva que cuando se encuentra fosforilada se impida el desplazamiento del lazo incluso en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} /CaM, reduciendo así la actividad de la nNOS. Por el contrario, la proteína fosfatasa 1 disminuye la fosforilación en esta posición, con lo que aumenta la actividad de la nNOS (Rameau et al., 2004).

Asimismo, la fosforilación de la Ser741 por CaMKI (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I*) encontrada en células transfectadas también inhibe la actividad de la nNOS (Song et al., 2004).

La fosforilación en Ser1412 aumenta la actividad de la nNOS, mientras que su desfosforilación por fosfatasas la disminuye (Rameau et al., 2007). Este residuo, al igual que en la eNOS forma parte de la módulo carboxi-terminal que se encuentra al final del dominio reductasa y los datos cristalográficos indican que adopta una conformación helicoidal (Garcin et al., 2004), y funciona a modo de “tapadera” del dominio reductasa obstruyendo la adecuada transferencia de electrones (Adak et al., 2001; Tiso et al., 2005) (Figura 4). Se ha descrito que la fosforilación de la nNOS en la Ser1412 en neuronas y en músculo esquelético la pueden llevar a cabo al menos Akt/PKB (Proteína quinasa B) (Fulton et al., 1999; Rameau et al., 2007; Sanchez-Blazquez et al., 2010), PKA (Yen et al., 2011) y AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Chen et al., 2000).

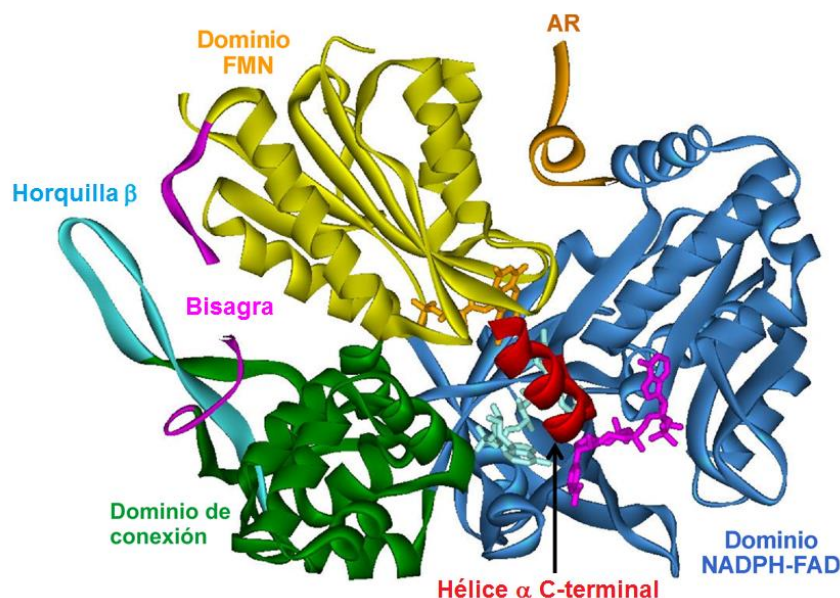


Figura 4. Estructura del dominio reductasa de la nNOS de rata en ausencia de CaM (PDB 1TLL). Los diagramas de cintas muestran el dominio FMN (amarillo) encajado en el dominio NADPH/FAD (azul) en una conformación oculta del FMN. Del extremo N-terminal al C-terminal: Dominio FMN (amarillo), dominio de conexión (verde) con una región bisagra flexible (magenta) y una horquilla β (ciano), el dominio NADPH-FAD (azul oscuro), el módulo carboxi-terminal helicoidal (rojo) que regula el flujo de electrones. El NADP^+ (magenta) y los cofactores FAD y FMN (dorado) se muestran con palitos. Figura adaptada de (Feng, 2012).

3.4. Interacción de la nNOS con otras proteínas.

La unión de calmodulina regula la actividad de la nNOS en función de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Li y Poulos, 2005). La CaM funciona como activador alostérico de la nNOS ya que en ausencia de CaM y Ca^{2+} el flujo de electrones desde el FAD al FMN se reduce (Matsuda y Iyanagi, 1999). La unión de CaM a la nNOS facilita el flujo de electrones desde el NADPH a las flavinas del dominio reductasa y del dominio reductasa al hemo (Guan y Iyanagi, 2003; Roman y Masters, 2006). A las concentraciones basales de Ca^{2+} la nNOS es inactiva mientras que cuando existen estímulos que aumentan dichos niveles, la CaM se une a la nNOS activándola.

La unión a Hsp90 y caveolina-3 también regula la actividad de la nNOS. Se ha detectado un aumento en la producción de $\bullet\text{NO}$ tras la formación de complejos nNOS-Hsp90 (Bender et al., 1999). En cambio, en músculo esquelético la unión de la nNOS a caveolina-3 suprime la síntesis de $\bullet\text{NO}$ al interferir con la unión de Ca^{2+} /CaM (Stamler y Meissner, 2001).

Como se ha comentado, la nNOS cuenta en su extremo N-terminal con un dominio PDZ que participa en la formación de dímeros activos e interacciona con numerosas proteínas en regiones específicas de la célula, contribuyendo a su localización subcelular y/o a su actividad enzimática; la asociación de su dominio PDZ con otras proteínas neuronales determina su enriquecimiento en las densidades post-sinápticas (Luo y Zhu; Zhou y Zhu, 2009). Las proteínas que tienen dominios PDZ se localizan típicamente en compartimentos especializados de la célula que son importantes para la agrupación de componentes de vías de transducción de señales en complejos múltiples. La actividad de la nNOS en localizaciones discretas subcelulares se consigue mediante el anclaje a la membrana o a proteínas citosólicas vía su dominio PDZ. El dominio PDZ de la nNOS presenta diversos modos diferentes de interacción con proteínas celulares. Experimentos llevados a cabo con una librería de péptidos en combinación con ensayos de doble híbrido de levadura, revelaron que la cavidad del dominio PDZ de la nNOS muestra una clara preferencia por proteínas celulares con residuos ácidos en el extremo C-terminal. De hecho, los ligandos proteicos cuyo extremo C-terminal se introduce en el dominio PDZ de la nNOS, presentan preferentemente la secuencia consenso -G(D/E)XV (Schepens et al., 1997; Stricker et al., 1997). Poco después, se demostró que la proteína CAPON, que presenta un motivo C-terminal cuya secuencia es -EIAV y que se expresa en grandes cantidades en el cerebro, también se unía al dominio PDZ de la nNOS. De hecho, CAPON compete con PSD-95 por la interacción con nNOS, de modo que puede influir en la nNOS mediante la regulación de su capacidad de asociarse con los complejos PSD-95/NMDAR (Jaffrey et al., 1998). Los resultados obtenidos en estudios de unión indican que CAPON está asociada estequiométricamente con la nNOS soluble (Jaffrey et al., 2002). De forma similar, se ha descrito que el extremo C-terminal de otras proteínas neuronales como el receptor de melatonina (-V-D-S-V), fosfofuctoquinasa-M (-EAAV) o NIDD (*nNOS-interacting DHHC domain-containing protein with dendritic mRNA*) (-EDIV) también se introduce en la cavidad del dominio PDZ de la nNOS (Firestein y

Bredt, 1999; Saitoh et al., 2004; Tochio et al., 1999). Además, la nNOS presenta una horquilla β a continuación del dominio PDZ (Hillier et al., 1999; Wang et al., 2000a) que media la formación de dímeros PDZ/PDZ de nNOS/PSD-95 y nNOS/ α 1-sintrofina en células neuronales (Hillier et al., 1999; Wang et al., 2000a).

PSD-95 a través de su dominio PDZ1, se une al extremo C-terminal de las subunidades de los NMDARs (Receptores de glutamato ionotrópicos de tipo N-Metil-D-Aspartato) y a través de su dominio PDZ2 al dominio PDZ de la nNOS formando así un complejo ternario en neuronas (Brenman et al., 1996a; Christopherson et al., 1999). Consecuentemente, la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR conlleva la producción de $\bullet\text{NO}$ mediante la activación de la nNOS mientras que la sobre-estimulación del NMDAR se cree que es responsable de la excitotoxicidad mediada por nNOS (Doucet et al., 2012). Dado que el dominio PDZ de α 1-sintrofina puede también asociarse con los NMDARs, se asume que todas estas proteínas residen en las proximidades de la densidad postsináptica (Cui et al., 2007).

3.5. Funciones fisiológicas y patológicas de la nNOS.

En los últimos años, un número cada vez mayor de estudios ha confirmado la importancia de nNOS en diversos procesos de señalización sináptica. Se ha visto cómo la nNOS está implicada en la modulación de funciones fisiológicas como el aprendizaje, memoria y neurogénesis (Zhou y Zhu, 2009). En el sistema nervioso central, la actividad de la nNOS está implicada en la regulación a largo plazo de la transmisión sináptica (tanto inhibición como potenciación a largo plazo) (Izumi et al., 1992; Izumi y Zorumski, 1993; Odell et al., 1991; Schuman y Madison, 1991). Se sospecha que la comunicación retrógrada a través de las uniones sinápticas está implicada en la formación de memoria y en modelos animales existen pruebas de que inhibidores de nNOS perjudican el aprendizaje y producen amnesia (Bohme et al., 1993; Holscher y Rose, 1992). También existen pruebas de que el $\bullet\text{NO}$ formado en el sistema nervioso central por la nNOS está implicado en la regulación de la presión sanguínea (Elkarib et al., 1993; Sakuma et al., 1992; Togashi et al., 1992). El bloqueo de la actividad de la nNOS en la médula y en el hipotálamo provoca hipertensión sistémica (Toda et al., 2009).

En la periferia, numerosos tejidos musculares lisos están inervados por nervios nitrérgicos, es decir, nervios que contienen nNOS y generan y liberan $\bullet\text{NO}$. El óxido nítrico producido por la nNOS en estos nervios puede ser considerado como un neurotransmisor no usual que estimula a la guanilato ciclasa sensible a $\bullet\text{NO}$ en sus células efectoras, con lo que disminuye el tono de diversos tipos de músculo liso incluyendo los vasos sanguíneos (Forstermann, 2000; Forstermann et al., 1994). La idea clásica de que la eNOS es la principal responsable de la regulación del tono vascular en la periferia, ha sido cuestionada mediante un estudio en humanos con S-metil-L-tiocitrulina (SMTc), un inhibidor selectivo de la nNOS. Este agente reduce el flujo sanguíneo basal en el antebrazo humano y en la circulación coronaria. Este efecto puede revertirse con L-Arg. Además, la SMTc no afecta la vasodilatación clásica mediada por eNOS en

respuesta a acetilcolina, sustancia P o fuerzas de rozamiento hemodinámicas. Estos resultados son coherentes con la idea de que la nNOS juega un papel importante en la regulación de tono vascular, independiente de los efectos de nNOS en el sistema nervioso central. Así pues, eNOS y nNOS pueden tener distintos papeles en la regulación fisiológica del tono microvascular humano *in vivo* (Melikian et al., 2009). Es interesante resaltar que las células de la musculatura lisa vascular también expresan nNOS en bajos niveles, y se ha visto que mantiene cierto grado de vasodilatación cuando la eNOS, que es predominante, no es funcional (Schwarz et al., 1999).

Los nervios nitrérgicos que contienen nNOS son responsables de la erección del pene, mediante la relajación de la musculatura lisa del cuerpo cavernoso (Kim et al., 1991; Rajfer et al., 1992). También en el cuerpo cavernoso, el cGMP modula la relajación de la musculatura lisa inducida por •NO (Rajfer et al., 1992). De las diversas fosfodiesterasas que degradan cGMP en el cuerpo cavernoso la más abundante es la isoforma 5 (Turko et al., 1999). Así pues, una actividad residual de nNOS es esencial para el efecto proeréctil de inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa 5 como el sildenafil (Viagra®) (Turko et al., 1999).

La nNOS también está implicada en diversas patologías, ya que la señalización anormal por •NO contribuye a una gran variedad de patologías neurodegenerativas tales como la excitotoxicidad tras un derrame cerebral, esclerosis múltiple, Alzheimer y Parkinson (Steinert et al., 2010). En neuronas, la hiperactividad de la nNOS debida a su estimulación por entrada masiva de Ca^{2+} ha sido implicada en la muerte neuronal mediada por NMDAR en accidentes cerebrovasculares (Lipton et al., 1993), fundamentalmente debido a la excitotoxicidad del •NO. Los altos niveles de óxido nítrico también pueden producir reducción de la energía metabólica debido a la inhibición de la respiración mitocondrial y de la glicolisis (Brown, 2010). Finalmente, algunas alteraciones del tono de la musculatura lisa en el tracto gastrointestinal pueden estar relacionadas con una producción excesiva de •NO por nNOS en nervios nitrérgicos periféricos (Lefebvre, 2002; Tottrup et al., 1991).

4. La Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS-NOS3).

La eNOS, inicialmente identificada por Lamas y Michel (Lamas et al., 1992b) se expresa principalmente en células endoteliales, si bien también se encuentra en miocitos cardiacos, plaquetas, ciertas neuronas del cerebro, en sincitio-trofoblastos de la placenta humana y en las células del epitelio tubular renal LLC-PK1 (Forstermann, 2000; Forstermann et al., 1994). Al igual que para la nNOS, la unión de Ca^{2+} /CaM es importante para la regulación de su actividad. La eNOS sintetiza •NO de forma pulsátil, aumentando la actividad de la enzima cuando aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} ya que el Ca^{2+} induce la unión de CaM (Hemmens y Mayer, 1998). En condiciones fisiológicas, la sensibilidad celular al •NO generado por el endotelio próximo es realmente asombrosa. Se ha podido determinar que incrementos pulsátiles en concentraciones de •NO cercanas a 1 pM dan lugar a ~30 nM de cGMP, lo cual es más que suficiente para activar a las quinasas dependientes de cGMP (Batchelor et al., 2010). Por

este motivo, la eNOS es una enzima altamente regulada, cuya actividad está modulada de muy diferentes maneras.

4.1. Los ciclos acilación-desacilación de la eNOS.

Numerosos resultados experimentales de los grupos de Michel y Sessa han demostrado que el extremo N-terminal de la eNOS está doblemente acilado: miristoilado en Gly2 y palmitoilado en Cys15 y Cys26, lo que dirige a esta isoforma a *rafts/caveolas* (Michel y Vanhoutte, 2010; Sessa, 2004). La miristoilación de la eNOS tiene lugar en la glicina que está dentro de una secuencia consenso N-terminal que no aparece en ninguna de las otras dos isoformas y, a diferencia de la palmitoilación, que es un proceso reversible y dinámicamente regulado, la miristoilación es irreversible. La presencia de varios residuos hidrofóbicos en la proximidad de las dos cisteínas (una repetición (Gly-Leu)₅) es responsable probablemente de la unión de los palmitatos en posiciones tan distantes. De hecho, la eliminación de las cinco leucinas que flanquean las cisteínas palmitoiladas, impide la palmitoilación (Liu et al., 1997). Tanto los sitios de miristoilación como de palmitoilación de la eNOS residen fuera del núcleo catalítico de la enzima (Figura 5), y una eNOS recombinante purificada que carece de los 52 aminoácidos N-terminales muestra actividad idéntica a la proteína silvestre (Rodríguez-Crespo et al., 1997). Por otro lado, células HEK293 transfectadas con un mutante de la eNOS Cys15/26Ser que no puede ser palmitoilado liberan menos •NO que las células transfectadas con la enzima silvestre, lo que sugiere que la palmitoilación juega un papel importante en determinar la liberación óptima de •NO en células intactas. La disminución de la liberación del gas en los mutantes no palmitoilables no es atribuible a alteraciones en las propiedades catalíticas ya que las enzimas silvestre y mutante purificadas son cinéticamente idénticas. Dado que la palmitoilación es necesaria para la localización de la eNOS en caveolas, esta localización regula la frecuencia y magnitud de liberación de •NO en respuesta al estímulo *in vivo* (Liu et al., 1996). El doble mutante Cys15/26Ser de eNOS (miristoilado pero no palmitoilado), aunque se asocia a fracciones membranosas en la misma medida que la proteína silvestre (Liu et al., 1996; Liu et al., 1997), no puede dirigirse de forma selectiva a las caveolas de la membrana plasmática (García-Cardena et al., 1996; Shaul et al., 1996). En definitiva, el papel de la palmitoilación es dirigir a la eNOS a caveolas, de forma que se restringe la señalización por •NO a dianas específicas dentro de un microentorno limitado en la superficie celular (García-Cardena et al., 1996). Además, estudios realizados con péptidos sintéticos que corresponden al extremo N-terminal de la eNOS han mostrado que el péptido miristoilado y doblemente palmitoilado se asocia preferentemente con membranas enriquecidas en colesterol y esfingomielina, dos especies lipídicas especialmente abundantes en las *rafts/caveolas* (Yelamos et al., 2006). Estudios muy elegantes realizados en células endoteliales con proteínas mutantes de eNOS fusionadas a GFP mostraron que el mutante no palmitoilable Cys15/26Ser se excluye de la membrana plasmática y se concentra en un patrón perinuclear difuso (Sowa et al., 1999). Además la recuperación de fluorescencia

tras fotoblanqueamiento del mutante no palmitoilable es dos veces más rápida que la de la eNOS-GFP silvestre, indicando que la palmitoilación puede influir en el tráfico subcelular. De hecho, la palmitoilación de la eNOS hace que la proteína sea menos móvil en las bicapas lipídicas, lo que apoya la idea de que esta modificación postraduccional es un mecanismo de “trampa cinética” que media las interacciones de la eNOS en Golgi y en microdominios de la membrana plasmática (Sowa et al., 1999). Finalmente, la sobreexpresión de APT1 (*Acyl-protein thioesterase-1*) acelera la despalmtoilación de la eNOS en células COS-7 cotransfectadas con eNOS y APT1 y esta despalmtoilación catalizada por APT1 es potenciada por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, un activador alostérico clave de la eNOS (Yeh et al., 1999).

En resumen, la N-miristoilación es necesaria para la asociación de eNOS a membrana y tráfico subcelular a través del complejo de Golgi de células transfectadas, mientras que la palmitoilación influye en su direccionamiento a caveolas (Liu et al., 1996).

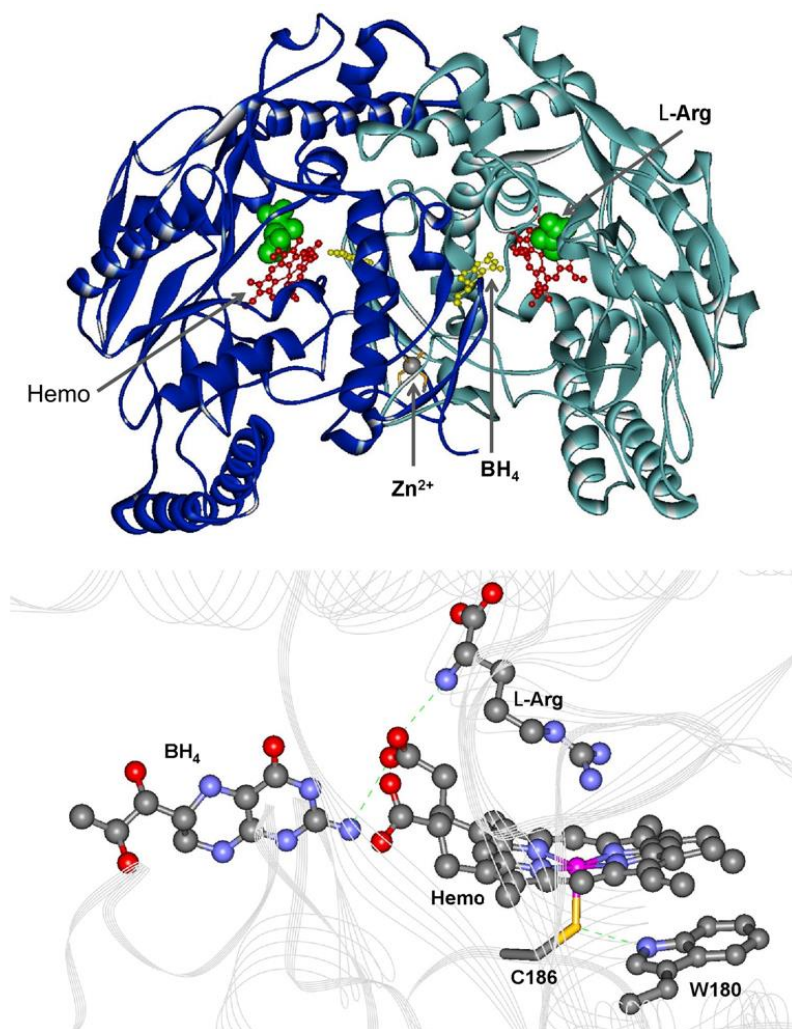
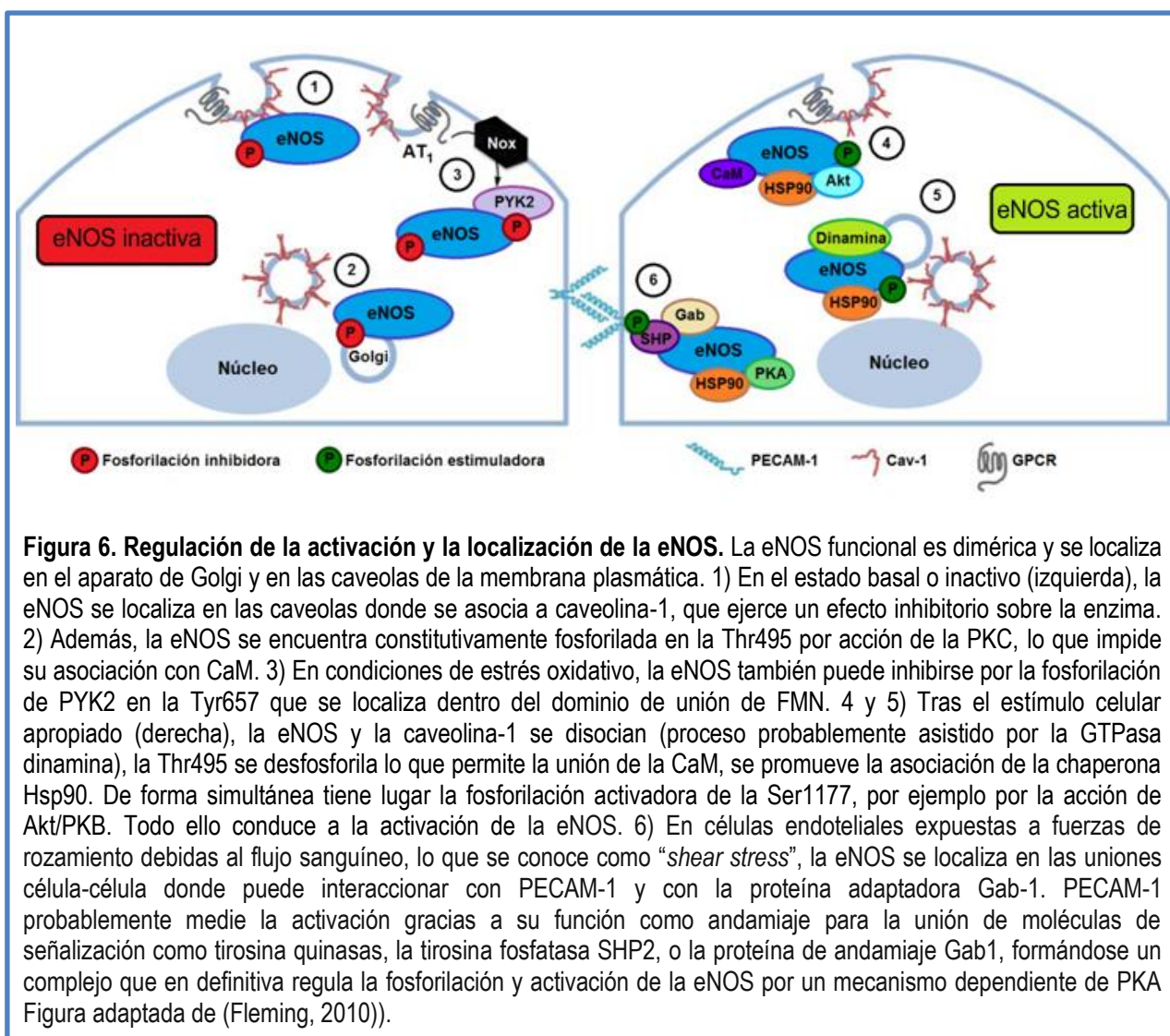


Figura 5. Estructura tridimensional del dominio hemo-oxigenasa de la eNOS. En la parte superior se señala la posición del Zn^{2+} , BH_4 , L-Arg y grupo hemo. En la parte inferior se muestra en detalle la estructura atómica del centro activo, con la Cys186 (tiolato que ejerce de ligando proximal) y el sustrato L-Arg en el lado distal del anillo tetrapirrólico. Adaptada de (Feng, 2012).

4.2. La localización subcelular de la eNOS.

Como se ha mencionado, en células endoteliales quiescentes, la eNOS se localiza específicamente en el aparato de Golgi y en pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática denominadas caveolas (Figura 6). Estos microdominios de la membrana se definen por la presencia de caveolina, una proteína de andamiaje tripalmitoilada (Sessa, 2004; Sowa et al., 1999). Las caveolas no sólo secuestran a la eNOS sino también diversos receptores y proteínas de señalización de diversas vías de transducción de señales, incluyendo proteínas acopladas a receptores G, proteínas G, receptores de factores de crecimiento y canales de calcio. Como se comentará posteriormente, la caveolina-1 es un efector negativo de la eNOS que al unirse directamente inhibe su actividad (Garcia-Cardena et al., 1997; Ju et al., 1997; Michel et al., 1997). Además de en el Golgi y en la membrana plasmática, parte de la eNOS se localiza asociada al citoesqueleto, encontrándose en un estado inactivo (Jiang et al., 2003; Sessa, 2004).



Agonistas como la bradiquina promueven el recambio de palmitato de la eNOS al igual que otras proteínas implicadas en señalización que se palmitoilan de un modo reversible. En definitiva, la acilación

de la eNOS determina su localización subcelular, lo que está directamente relacionado con su actividad.

Tras su activación parece que la eNOS se transloca al citosol, aunque no existe unanimidad. La discrepancia se debe a que gran parte de la eNOS se localiza en el complejo de Golgi, donde se detecta actividad de la misma. De las dos posibilidades, bien que la eNOS se active en el complejo de Golgi o bien que lo haga en la membrana plasmática y posteriormente se transloque al Golgi, la segunda hipótesis es la más aceptada (Govers y Rabelink, 2001).

4.3. La fosforilación de la eNOS.

Diversas serina, treonina y tirosina quinasas celulares pueden fosforilar a la eNOS (Figura 7). Aunque existen numerosos sitios putativos de fosforilación, las consecuencias funcionales de la fosforilación en la Ser1177 (en la isoforma humana, Ser1179 en la bovina) que se encuentra en la extensión C-terminal al final del dominio reductasa y de la fosforilación en la Thr495 (que corresponde con la Thr497 bovina) dentro del dominio de unión de CaM, son sin duda las más estudiadas.

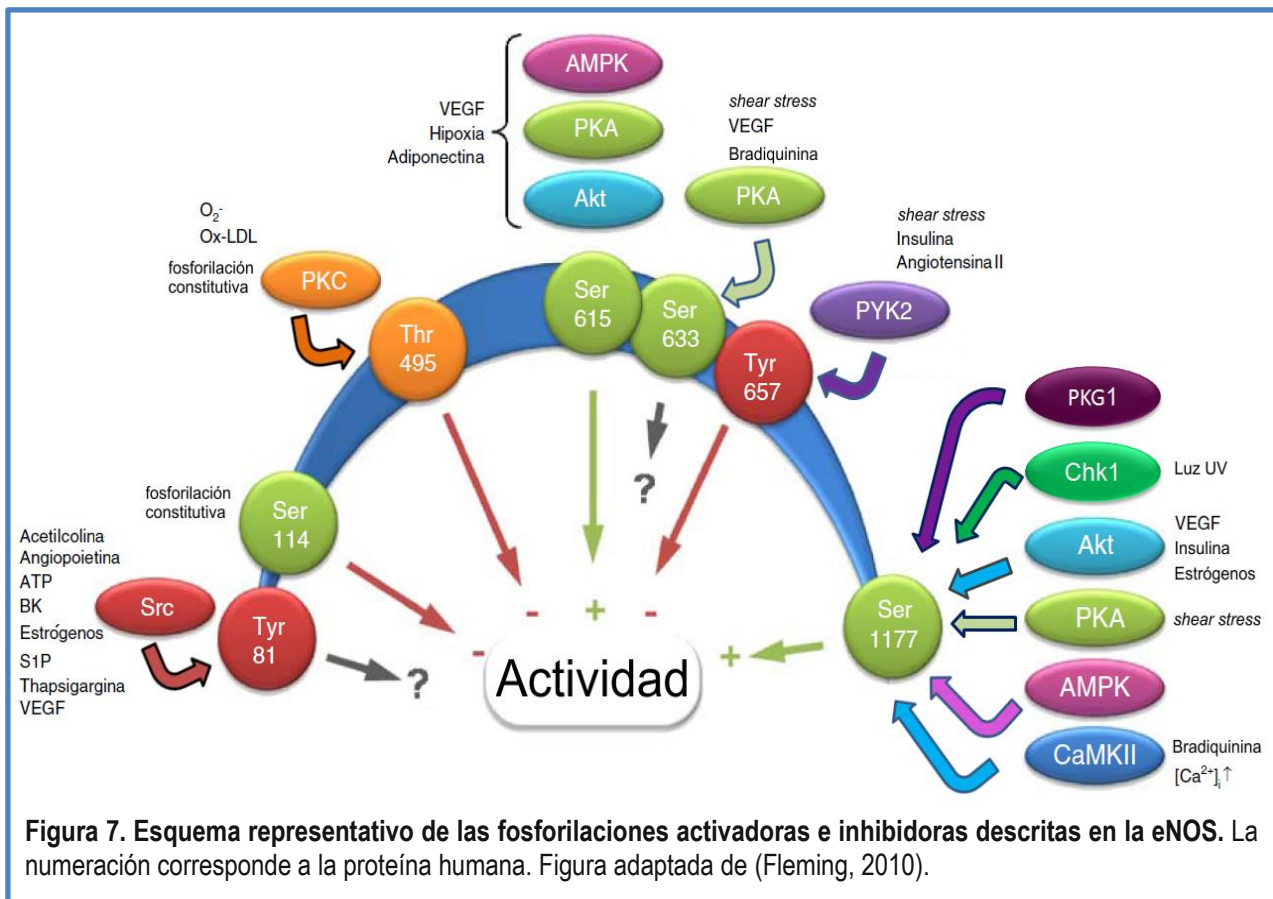


Figura 7. Esquema representativo de las fosforilaciones activadoras e inhibidoras descritas en la eNOS. La numeración corresponde a la proteína humana. Figura adaptada de (Fleming, 2010).

Utilizando anticuerpos anti-fosfo Ser1177 se ha podido demostrar que en células endoteliales en cultivo no estimuladas, en esta posición la eNOS no está apenas fosforilada. Sin embargo, tras estimulación con VEGF (Factor de crecimiento derivado de endotelio) (Fulton et al., 1999; Michell et al., 2001), bradiquinina (Fleming et al., 2001; Schneider et al., 2003) o fuerzas de rozamiento hemodinámicas (Dimmeler et al., 1999; Gallis et al., 1999) se fosforila rápidamente. La fosforilación de la Ser1177, induce

un cambio conformacional que estimula el flujo de electrones dentro del dominio reductasa, aumenta la sensibilidad al Ca^{2+} de la enzima y representa un mecanismo adicional e independiente de activación de la eNOS (Fleming y Busse, 2003; McCabe et al., 2000). La fosforilación de la eNOS por Akt/PKB (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999) y AMPK (Chen et al., 1999) y otras cuatro quinasas más (PKA (Zhang et al., 2006), cGK-I/PKG (*cGMP-dependent protein kinase I* o PKG) (Butt et al., 2000), Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) (Park et al., 2011) y CaMKII) que convergen en la misma serina activadora ha sido ampliamente descrita y en todos los casos la fosforilación se correlaciona con activación y aumento de la síntesis de $\bullet\text{NO}$ (Dudzinski y Michel, 2007). La regulación de la actividad de las quinasas implicadas en este proceso varía según el estímulo aplicado. Por ejemplo, los estrógenos y el VEGF desencadenan la fosforilación de la eNOS principalmente vía la serina/treonina quinasa Akt/PKB; la insulina probablemente activa tanto Akt/PKB como AMPK; la inducción de la fosforilación por bradiquinina, ionóforos de Ca^{2+} y thapsigargina se ve mediada por CaMKII y las fuerzas de rozamiento hemodinámicas desencadenan la fosforilación principalmente a través de la activación de PKA. Estudios llevados a cabo con ratones deficientes en Akt1 que expresaban la eNOS con mutaciones en el sitio de fosforilación por esta quinasa (Ser1176 en ratón), bien que la hicieran constitutivamente activa (Ser1176Asp) o no fosforilable (Ser1176Ala), demostraron que Akt1 es un regulador muy importante de la función de eNOS también *in vivo* (Schleicher et al., 2009). De hecho, la angiogénesis postnatal defectiva característica de los ratones Akt1(-/-) fue rescatada cuando estos ratones se cruzaron con otros que expresaban la eNOS constitutivamente activa, pero no cuando se cruzaron con los ratones que expresaban la eNOS no fosforilable (Schleicher et al., 2009).

La Thr495 (Thr497 en la eNOS bovina) está constitutivamente fosforilada bajo condiciones no estimuladas en todas las células endoteliales investigadas y se trata de un sitio regulador negativo, es decir, su fosforilación está asociada con una disminución de la actividad de la enzima (Fleming et al., 2001; Harris et al., 2001; Michell et al., 2001). Esta fosforilación es probable que interfiera con la unión de CaM a la hélice anfipática que conecta ambos dominios (Figura 8). De hecho, la desfosforilación de la Thr495 se asocia con estímulos que elevan la concentración intracelular de Ca^{2+} y aumentan la actividad de la eNOS. Se une considerablemente más calmodulina a la eNOS en células endoteliales estimuladas con agonistas como bradiquinina, histamina o un ionóforo de Ca^{2+} cuando la Thr495 no está fosforilada (Fleming y Busse, 2003; Fleming et al., 2001). Sin embargo la desfosforilación de esta treonina también se ha visto que favorece el desacoplamiento de la eNOS, con su consiguiente producción de O_2^- (Lin et al., 2003). Por lo tanto la fosforilación/desfosforilación de la Thr495 puede ser un mecanismo intrínseco interruptor que determina si la eNOS genera $\bullet\text{NO}$ frente a superóxido en las células. La quinasa constitutivamente activa que probablemente fosforila a la eNOS en la Thr495 es PKC, aunque no está claro qué isofoma(s) están implicadas (Fleming et al., 2001; Matsubara et al., 1996; Michell et al., 2001).

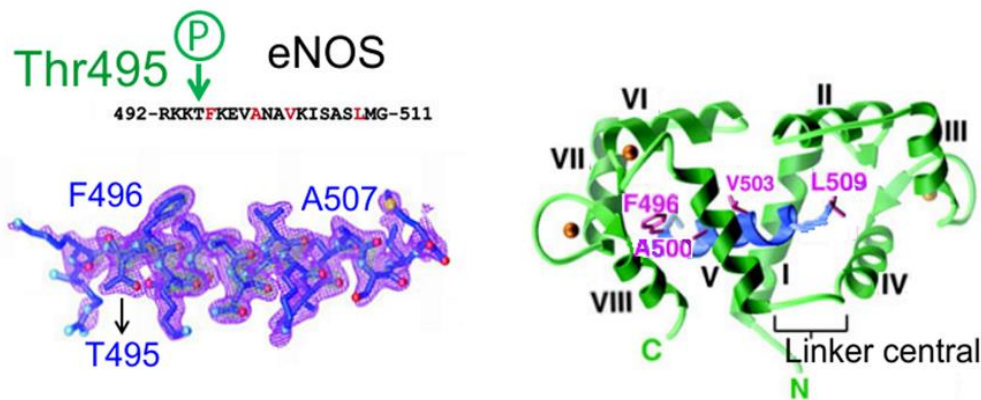


Figura 8. La fosforilación de la eNOS en Thr495 en la hélice a la que se une la calmodulina es una modificación inactivante. En ausencia de fosforilación, la Thr495 interacciona con los residuos Met124 y Glu127 de la CaM. La eNOS fosforilada en Thr495 es incapaz de unir CaM.

Pese a que la activación de la eNOS está ligada a cambios simultáneos en la fosforilación de Ser1177 y Thr495, existen otros sitios de fosforilación. Por ejemplo, la Ser633 se localiza dentro de uno de los lazos autoinhibitorios que se pliega de modo tal que físicamente impide el acceso de calmodulina a su sitio de unión, con lo que se bloquea la actividad de la enzima. Aunque la Ser633 puede ser fosforilada *in vitro* por PKA y PKG (Butt et al., 2000), la relevancia funcional de esta observación no está clara y los escasos estudios experimentales que inicialmente comparaban el potencial de la fosforilación en la Ser1177 con la Ser633 en la regulación de la actividad de la eNOS concluyeron que la Ser1177 jugaba un papel más importante en la regulación de la producción de •NO, mientras que la fosforilación en la Ser633 no podía ser detectada o no existían consecuencias evidentes debidas a la fosforilación (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). Probablemente *in vivo*, la eNOS sea fosforilada por PKA en Ser633 tras la estimulación por fuerzas de rozamiento hemodinámicas, VEGF, 8-Br-cAMP o bradiquinina, aunque en menor nivel que en Ser1177 y Thr495 (Boo et al., 2002; Mitchell et al., 2002). De cualquier manera hay que destacar que la mimetización de la fosforilación mediante la mutación de Ser por Asp, aumentó en dos veces la actividad de la proteína purificada (Mitchell et al., 2002).

La fosforilación en la Ser615 por parte de PKA y Akt/PKB fue identificada mediante mapeo de fosfopéptidos. La mimetización de la fosforilación en la Ser615 aumenta significativamente la sensibilidad a Ca^{2+} /CaM de la eNOS pero no cambia la actividad de la enzima (Mitchell et al., 2002). Sin embargo, la Ser615 parece ser importante para la regulación de la fosforilación en otros sitios así como para interacciones proteína-proteína y el ensamblaje del denominado “signalosoma” de eNOS (Bauer et al., 2003).

La Ser114 está constitutivamente fosforilada y aunque inicialmente se describió que bradiquinina, ácido lisofosfatídico (Kou et al., 2001) y fuerzas de rozamiento hemodinámicas (Gallis et al., 1999) aumentaban su fosforilación, más recientemente se ha descrito que se trata de un sitio regulador

negativo que puede ser más importante para la regulación de la síntesis de •NO inducida por ciertos agonistas, en contraposición con la síntesis en condiciones basales (Bauer et al., 2003).

La Tyr81, presente en el dominio hemo-oxigenasa se fosforila en condiciones de estrés oxidativo o cuando se sobreexpresa v-Src (Fulton et al., 2005). Parece que esta fosforilación no modifica la actividad de la eNOS directamente pero puede modular la sensibilidad de la enzima por Ca^{2+} , alterar interacciones proteína-proteína o cambiar la localización subcelular. La fosforilación de la Tyr81 dependiente de Src tiene lugar tras la estimulación de células endoteliales con agonistas como thapsigargina, VEGF, bradiquinina, ATP, esfingosina-1-fosfato, estrógeno, angiopoietina y acetilcolina (Fulton et al., 2008).

La Tyr657 se localiza dentro del dominio de unión de FMN y se ha visto que se fosforila en células que sobreexpresan tanto c-Src como PYK2 (*Proline-rich tyrosine kinase*), siendo la quinasa PYK2 la que se considera responsable de la fosforilación *in vivo* (Fisslthaler et al., 2008). Parece que su fosforilación tiene una función reguladora negativa. Si se observa la estructura cristalina de la nNOS, la fosforilación de un residuo de tirosina (Tyr889 en la nNOS de rata), que está en las proximidades del dominio FMN podría impedir su movimiento, bloqueando al dominio FMN en su posición aceptora de electrones que no podría transferirlos al módulo catalítico, con lo que se inhibiría la actividad de la enzima (Garcin et al., 2004). Dado que la Tyr657 es el residuo equivalente en la secuencia de la eNOS humana, es muy probable que su fosforilación esté asociada con una pérdida de la producción de •NO (Fleming, 2010).

4.4. Interacción de la eNOS con otras proteínas.

La actividad de la eNOS está regulada por interacción con numerosas proteínas celulares, siendo la calmodulina la primera asociación descrita (Busse y Mulsch, 1990). Esta proteína citosólica de 16.7 kDa consta de dos dominios globulares unidos por una hélice α y posee cuatro motivos de unión a Ca^{2+} , dos en el extremo amino y dos en el carboxilo con una estructura conocida como “mano E-F”. Su estructura depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular ya que adopta dos conformaciones diferentes en función de su asociación con este catión (Babu et al., 1985). Cuando existe un estímulo que aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} , se une a la CaM y en ese momento la CaM se une a la eNOS en un fragmento polipeptídico compuesto por una hélice anfipática situado entre los dominios hemo-oxigenasa y reductasa de la misma, región bisagra. Esto provoca el desplazamiento de la región autorreguladora (Nishida y de Montellano, 1999; Salerno et al., 1997) adoptando una conformación que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa al hemo-oxigenasa y la síntesis de •NO. La asociación de CaM a su sitio de unión en la eNOS está determinada por múltiples interacciones moleculares, así como por la fosforilación/desfosforilación de la Thr495 (Fleming et al., 2001). También se ha demostrado que otros procesos, como la unión de Hsp90 y la fosforilación de la Ser1177 afectan la asociación de CaM con la eNOS (Gratton et al., 2000). Hay autores que han propuesto que la fosforilación de la propia CaM pueda

producir un efecto inhibitorio sobre la eNOS, contrario al efecto activador que en condiciones normales ejerce esta proteína (Greif et al., 2004).

La unión de caveolina-1 a su sitio de unión (Phe350-Trp358) en la eNOS inicialmente se propuso que antagonizaba con la unión de CaM y con ello inhibía la actividad de la enzima (Fulton et al., 2002; Garcia-Cardena et al., 1997). En un principio se propuso que el sitio de unión de caveolina residía entre el dominio hemo y la región de unión de CaM junto a un residuo de glutamato que es necesario para la unión de L-Arg. Ese trabajo sugería que caveolina-1 podía interferir en la reducción del hierro del hemo (Garcia-Cardena et al., 1997). Sin embargo, el análisis de la estructura cristalina de la eNOS indica que es poco probable que este sitio pueda ser accesible. Por otro lado, otros investigadores han observado que existe interacción tanto del dominio N-terminal como del C-terminal de caveolina-1 y el dominio hemo-oxigenasa de la eNOS (Ju et al., 1997). Posteriormente se ha comprobado que caveolina-1 interacciona independientemente tanto con el dominio hemo-oxigenasa como con el reductasa de la eNOS y que la unión con el dominio reductasa compromete su capacidad para unir CaM y donar electrones al grupo hemo inhibiendo de esta forma la síntesis de •NO (Ghosh et al., 1998).

La chaperona Hsp90 (*Heat shock protein 90*) está implicada en el plegamiento de las NOSs y se ha demostrado que es necesaria para la incorporación del hemo en la proteína inmadura (Billecke et al., 2002). Además, Hsp90 participa como parte integrante de numerosas cascadas de señalización gracias a su función como molécula de andamiaje. Hsp90 se puede asociar con la eNOS en células endoteliales en reposo, mientras que la estimulación con VEGF, histamina, el flujo sanguíneo y los estrógenos aumentan la interacción entre Hsp90 y eNOS al mismo tiempo que aumenta la síntesis de •NO (Garcia-Cardena et al., 1998). De hecho, la estimulación con VEGF recluta a eNOS y Akt/PKB a una región adyacente del mismo dominio de Hsp90, con lo que facilita la fosforilación de eNOS por Akt/PKB y su activación (Fontana et al., 2002). La asociación de Hsp90 y eNOS parece estar determinada por la fosforilación de tirosina de ambas proteínas estimulada por el agonista y, en condiciones de estrés nitrosativo, Hsp90 puede ser S-nitrosilada en un residuo de su dominio C-terminal lo que afecta a su capacidad de interaccionar con otras (Retzlaff et al., 2009). Se esperaría que estas modificaciones en la actividad de Hsp90 tuvieran consecuencias en la regulación de la eNOS ya que, como se ha comentado, muchas de las quinasas que se ha visto que fosforilan a la eNOS en serina o treonina físicamente interaccionan con la enzima a través de la unión con Hsp90 (Fontana et al., 2002). Por otro lado, dado que tanto la actividad ATPasa de Hsp90 como su efecto positivo en la actividad de la eNOS resultan inhibidos tras su S-nitrosilación, esto podría suponer un mecanismo de regulación de la actividad de la eNOS por el producto de la reacción que cataliza, cuando sus niveles intracelulares sean lo suficientemente elevados (Martinez-Ruiz et al., 2005).

Se ha descrito la interacción de la eNOS con otras muchas proteínas como por ejemplo la guanilato ciclasa soluble, de modo que la proximidad de ambas proteínas aumentaría la efectividad de la

señalización por $\bullet\text{NO}$ y reduciría la posibilidad de inactivación de $\bullet\text{NO}$ por O_2^- intracelular (Venema et al., 2003). También se ha descrito que la eNOS aumenta su actividad al unirse a la GTPasa dinamina-2 (Cao et al., 2001). PECAM-1 (*Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* también llamada CD31) (Dusserre et al., 2004), que se concentra en los contactos célula-célula y media uniones homofilicas entre células endoteliales adyacentes también se une a la eNOS. Lo más probable es que PECAM-1 medie la activación de las células endoteliales en respuesta a fuerzas de rozamiento hemodinámicas gracias a su función como andamiaje para la unión de moléculas de señalización como tirosina quinasas, la tirosina fosfatasa SHP2 (*Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase 2*), o la proteína de andamiaje Gab1 (*Grb2-associated binder 1*) (Fleming, 2010). Por último, eNOS también interacciona directamente con el receptor B2 de bradiquinina, el receptor AT1 de angiotensina II y el receptor de endotelina-1 (Marrero et al., 1999).

4.5. Funciones fisiológicas de la eNOS.

La eNOS es un regulador homeostático de numerosas funciones cardiovasculares esenciales. El $\bullet\text{NO}$ que produce dilata todo tipo de vasos sanguíneos mediante la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y el aumento de cGMP en células de músculo liso (Forstermann et al., 1986; Ignarro et al., 1986; Rapoport et al., 1983). La delección del gen de la eNOS conlleva un aumento de la presión sanguínea (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996). Además, el $\bullet\text{NO}$ liberado hacia la luz del vaso es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y de la adhesión a la pared vascular (Alheid et al., 1987; Busse et al., 1987; Radomski et al., 1987). Además de proteger frente a trombosis, el $\bullet\text{NO}$ también impide la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas que estimula la proliferación de la musculatura lisa y su producción de moléculas de la matriz. La eNOS también es crítica en la remodelación vascular adaptativa a cambios crónicos en el flujo (Rudic et al., 1998).

La eNOS controla la expresión de genes implicados en aterogénesis. El $\bullet\text{NO}$ disminuye la expresión de la proteína quimioatrayente MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*), que juega un papel clave en el reclutamiento subendotelial de monocitos (Zeiher et al., 1995). El óxido nítrico puede también inhibir la adhesión leucocitaria a la pared del vaso, bien interfiriendo con la capacidad de la molécula de adhesión de leucocitos CD11/CD18 para unirse a la superficie celular endotelial o bien suprimiendo la expresión de dicha molécula en leucocitos (Arndt et al., 1993; Kubes et al., 1991). Dado que la adhesión leucocitaria es una etapa temprana en el desarrollo de aterosclerosis, el $\bullet\text{NO}$ puede proteger contra el comienzo de la misma.

El endotelio actúa como una barrera, de modo que la apoptosis de células endoteliales conllevaría la pérdida de la integridad de la monocapa endotelial y esto contribuiría a la iniciación de procesos proinflamatorios. El óxido nítrico derivado del endotelio evita la apoptosis de las células endoteliales inducida por citoquinas proinflamatorias y factores pro-ateroscleróticos como las especies reactivas de

oxígeno (ROS) y angiotensina II. La supresión de la apoptosis puede contribuir a los efectos antiinflamatorios y anti-ateroescleróticos del •NO derivado de endotelio (Dimmeler y Zeiher, 1999).

El •NO inhibe la síntesis de DNA, la mitogénesis y la proliferación de las células de la musculatura lisa vascular y estos efectos antiproliferativos están mediados por cGMP (Garg y Hassid, 1989; Hogan et al., 1992; Nakaki et al., 1990; Nunokawa y Tanaka, 1992; Southgate y Newby, 1990). La inhibición de la agregación plaquetaria y de la adhesión protege a la musculatura lisa de la exposición a factores de crecimiento derivados de plaquetas, de modo que el óxido nítrico también evita una etapa más tardía de la aterogénesis, la formación de la placa fibrosa. Por todo esto se puede considerar al •NO producido por las células endoteliales como un factor anti-ateroesclerótico (Forstermann, 2008).

El •NO producido por la eNOS desempeña un papel clave en la angiogénesis post-natal ya que media señales desencadenadas por factores angiogénicos. En ratones, el •NO derivado de la eNOS es fundamental para el desarrollo de la vasculatura de los pulmones en el feto y la morfogénesis del pulmón (Han y Stewart, 2006). La eNOS también es importante para la formación colateral y la angiogénesis post-isquemia (Murohara et al., 1998). Los efectos positivos del •NO en la supervivencia de las células endoteliales es probable que contribuyan a los efectos pro-angiogénicos del •NO (Dimmeler y Zeiher, 1999).

El •NO derivado de la eNOS juega un papel en la activación de células progenitoras endoteliales. Ratones a los que se ha delecionado el gen de la eNOS, muestran una pérdida en la neovascularización, lo que está relacionado con un defecto en la movilización de células progenitoras. En estos ratones, la movilización de células progenitoras por VEGF está disminuida. El hecho de que la inyección intravenosa de células progenitoras normales rescate esta neovascularización defectuosa, sugiere que la movilización de células progenitoras desde la médula ósea está afectada en estos ratones y que la eNOS expresada por las células del estroma de la médula ósea influye en el reclutamiento de células *stem* y progenitoras (Aicher et al., 2003). También en pacientes con cardiomiopatía isquémica, las células mononucleares de la médula ósea muestran una capacidad de neovascularización reducida *in vivo* y el pretratamiento de las células de la médula ósea de estos pacientes con un potenciador de la expresión y de la actividad de la eNOS aumenta significativamente la expresión y la actividad de la enzima, lo que conlleva un aumento de la capacidad migratoria de las células de la médula ósea *in vitro* y mejora la capacidad de neovascularización de estas células en un modelo murino *in vivo* (Sasaki et al., 2006; Wohlfart et al., 2008).

5. La Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS-NOS2).

En general, los niveles celulares de iNOS son bajos, si bien como parte de la respuesta sistémica inflamatoria su expresión en fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), hepatocitos, condrocitos y células de músculo liso puede ser inducida transcripcionalmente por endotoxinas (LPS),

citoquinas inflamatorias (Ifn- γ) y otros agentes. El \bullet NO generado por la iNOS contribuye al efecto bactericida de los fagocitos y de las células implicadas en los mecanismos de defensa del organismo. Además, diversos estímulos inflamatorios son también capaces de inducir la expresión de iNOS en otros sistemas, tales como células del endotelio vascular. Por otro lado, ciertas células de riñón son capaces de expresar iNOS de un modo constitutivo, al igual que sucede en los folículos de los ovarios durante ciertas fases del ciclo (VanVoorhis et al., 1995). Lo mismo ocurre en otros tejidos humanos, donde se ha comprobado la existencia de iNOS, aunque en bajos niveles, sin necesidad de un estímulo proinflamatorio previo (Park et al., 1996). De hecho, aunque inicialmente fue identificada en macrófagos, su expresión puede ser estimulada prácticamente en cualquier célula o tejido, siempre y cuando los agentes inductores apropiados hayan sido identificados (Forstermann, 2000; Forstermann et al., 1994).

Cotraduccionalmente la iNOS se une a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ de forma esencialmente irreversible, incluso a concentraciones bajas de Ca^{2+} . La irreversibilidad entre la CaM y la iNOS se explica a partir de los numerosos contactos entre ambas proteínas, mostrados recientemente en una estructura cristalina del complejo (Figura 9) (Xia et al., 2009). Durante mucho tiempo se ha considerado que la iNOS servía principalmente para generar grandes cantidades de \bullet NO con el fin de matar bacterias y células tumorales, en definitiva, para ejercer una función de defensa (Bogdan, 2001). Hoy en día se sabe que la actividad de la iNOS está modulada mediante modificaciones postraduccionales, interacción con otras proteínas o localización subcelular específica. Además, poco a poco se han ido descubriendo nuevos papeles de la iNOS en la señalización celular, como por ejemplo en la reabsorción osteoclástica de los huesos (van't Hof et al., 2000).

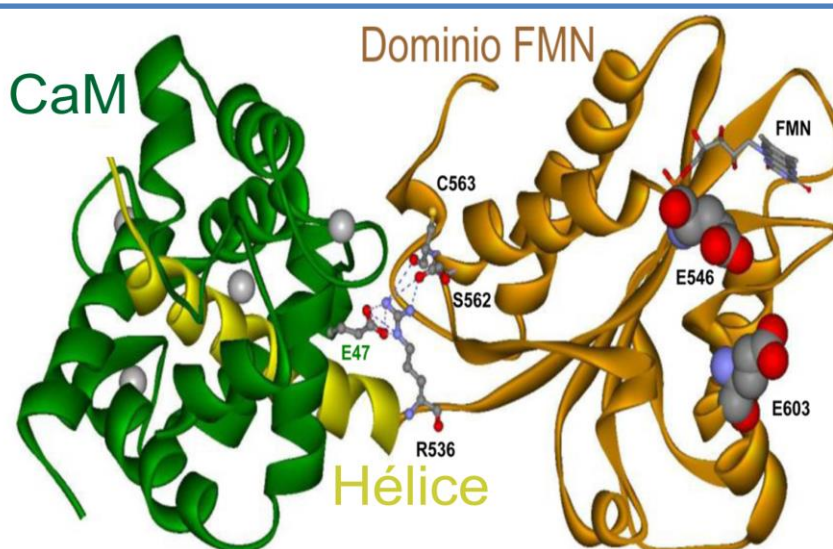


Figura 9. Estructura del complejo del dominio FMN de la iNOS humana con CaM (PDB 3HR4). El dominio FMN aparece en dorado, y el dominio de unión de CaM entre el FMN y el dominio hemo-oxigena se ha coloreado en amarillo. La molécula de CaM pivota en torno a los residuos Arg536(NOS) y Glu47(CaM). La Arg536 forma puentes de H con los oxígenos carbonílicos del esqueleto polipeptídico de Ser562 y Cys563. Adaptada de (Feng, 2012).

5.1. Papel funcional de la extensión C-terminal de la iNOS.

Como hemos visto anteriormente, cuando se compara con otras NADPH di-flavina reductasas de mamíferos, la iNOS tiene una extensión C-terminal de 21 aminoácidos. En la actualidad se dispone de una estructura cristalográfica del dominio FMN de la iNOS unido a Ca^{2+} /CaM (Xia et al., 2009), si bien no se conoce la estructura tridimensional del dominio reductasa completo. Por analogía con la estructura cristalográfica del dominio reductasa de la nNOS (Garcin et al., 2004) se asume que el módulo C-terminal regulador adopta una conformación helicoidal que encaja en un canal cargado negativamente a lo largo de la interfaz FAD/FMN, ocultando a las flavinas del disolvente. Sin embargo, en el caso de la iNOS, en esta extensión C-terminal no aparecen residuos de Ser, Thr o Tyr que pudieran fosforilarse, tal y como ocurre en las isoformas constitutivas (Figura 3).

La clonación de la iNOS a partir de macrófagos murinos Raw 264.7 por parte de Xie y Nathan dio lugar a dos tipos de cDNA: uno más largo que codificaba para una isoforma de 1144 aminoácidos, cuya secuencia coincidía con la de la proteína purificada y otro con una secuencia codificante más corta de 1122 aminoácidos, en la que los últimos 10 aminoácidos C-terminales diferían completamente de los de la isoforma larga (Xie et al., 1992). Pronto se puso de manifiesto que cualquier alteración (deleción, mutación puntual, etc) en la secuencia HEDIF presente en el extremo C-terminal de las tres NOSs producía proteínas inactivas. Ésta era la primera demostración de que el extremo C-terminal de la iNOS era una región funcional crítica (Xie et al., 1994). Posteriormente se estudió de nuevo el papel funcional de la “cola” C-terminal de la iNOS, para lo cual se delecionaron esos 21 residuos tanto de la iNOS murina completa como del dominio reductasa y compararon los resultados obtenidos con los de ambas construcciones sin deleccionar (Roman et al., 2000b). En este caso observaron que tanto la proteína completa como el dominio reductasa truncados mostraban una capacidad de reducción de citocromo c que era de 7 a 10 veces mayor que la de las formas no truncadas. Además la forma completa delecionada catalizaba la síntesis de $\bullet\text{NO}$ un 20% más rápido que la proteína completa no truncada. Todos estos experimentos parecen indicar que los incrementos en las tasas de transferencia de electrones (actividad reductasa) no se traducen a los mismos niveles en términos de producción de $\bullet\text{NO}$, probablemente debido al “*uncoupling*” inherente al sistema. Alternativamente, las delecciones realizadas podrían ser demasiado drásticas y las proteínas resultantes podrían ser inestables. Se debe tener en cuenta en este contexto, que la tasa de transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio hemo-oxigenasa, determina las tasas de “*turnover*” y producción de $\bullet\text{NO}$ en las distintas NOSs (Nishida y de Montellano, 2001) y las delecciones en el dominio reductasa podrían conferir la capacidad de regular la transferencia de electrones a través de este dominio.

La razón por la cual las NOSs han evolucionado introduciendo estas “tapaderas” autorreguladoras en sus extremos C-terminales no se comprende completamente todavía. Tanto en la eNOS como en la nNOS, la extensión C-terminal presenta un sitio consenso de fosforilación por Akt/PKB (R-X-R-X-X-

(S/T)). De hecho, en el caso de la eNOS, la actividad de numerosas quinasas converge en el mismo residuo de serina (Ser1177 o 1179 de la eNOS bovina o humana) y la fosforilación se correlaciona con activación y aumento en la síntesis de •NO (Figura 7). Tanto en la eNOS como en la nNOS la “cola” automodulatoria C-terminal resulta “liberada” tras la fosforilación, en un proceso que conlleva un aumento en la transferencia de electrones y en la síntesis de •NO y/o un aumento en la sensibilidad de la enzima por Ca^{2+} /CaM. El caso de la iNOS es diferente al de las otras dos isoformas ya que en su extremo C-terminal no se ha encontrado ningún residuo fosforilado. Sin embargo, los estudios de delección ya comentados han mostrado que esta región está también limitando la transferencia de electrones y por esta razón regulando la actividad de liberación de •NO por la iNOS. A diferencia de las isoformas constitutivas, la iNOS tiene una secuencia consenso de unión a dominios PDZ en su extremo C-terminal.

5.2. La fosforilación de la iNOS.

Se ha visto que la iNOS de macrófagos de ratón se fosforila en residuos de Ser y Thr (Vodovotz et al., 1995), si bien los aminoácidos concretos no han sido identificados y los efectos en la actividad no han sido medidos. En condiciones basales la iNOS de macrófagos murinos Raw 264.7 contiene fosfotirosinas y el tratamiento con pervanadato aumenta la fosforilación de tirosinas y la actividad de la iNOS (Pan et al., 1996), si bien las quinasas/fosfatasas implicadas así como los sitios de fosforilación no han sido identificados. En trabajos posteriores se ha visto que la cotransfección de iNOS y Src constitutivamente activa en células HEK293 causa un aumento en la fosforilación de Tyr151 (Hausel et al., 2006). Por otro lado, la actividad de la iNOS aumenta considerablemente mediante la activación del receptor B1R (*B-1-kinin receptor*) en células endoteliales humanas o en células HEK293 transfectadas, generando de 2.5 a 5 veces más •NO que las células estimuladas únicamente con L-Arg (Zhang et al., 2007), siendo este aumento dependiente de la activación de la MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) vía B1R. En células HEK293 transfectadas con la iNOS humana y con B1R, ERK fosforila a la iNOS en la Ser745, la cual reside en el dominio reductasa.

Muy recientemente también se ha identificado el residuo Tyr1055 de la iNOS como sustrato de la quinasa Src (Tyryshkin et al., 2010). Esta modificación postraducciona es activadora y aumenta la vida media de la proteína dentro de la célula. Así la fosforilación de este residuo de la iNOS por Src juega un importante papel en la regulación de la iNOS y en la producción de •NO y esto podría dar cuenta en parte de la implicación de Src en inflamación y cáncer, procesos en que también se ha implicado a la iNOS.

5.3. La palmitoilación de la iNOS.

En estudios realizados en nuestro grupo (Navarro-Lerida et al., 2006; Navarro-Lerida et al., 2004), se demostró que la iNOS se palmitoila en la cisteína en posición 3 de su secuencia y esta palmitoilación es necesaria para la total actividad de la iNOS tanto en células transfectadas como en células inducidas

por citoquinas. Además dicha palmitoilación es necesaria para la progresión de la proteína a través de las rutas de secreción celular. La proteína mutante Cys3Ala se ve atrapada en el Golgi, es incapaz de sintetizar •NO y su progresión a lo largo de las rutas secretoras celulares se ve claramente impedida.

5.4. Interacción de la iNOS con otras proteínas.

La iNOS interacciona con al menos 10 proteínas diferentes. Mediante la técnica del doble híbrido de levadura, utilizando como cebo los 70 primeros aminoácidos de la iNOS, el grupo de Lowenstein descubrió la existencia de dos proteínas capaces de interactuar con dicha región. La primera era una proteína de 110 kDa expresada en macrófagos a la que se llamó NAP110 (*NOS-associated protein-110 kDa*). Esta proteína interacciona directamente con el extremo N-terminal de la iNOS y, presumiblemente, inhibe la actividad catalítica al impedir la formación de homodímeros de iNOS. Así, la expresión de NAP110 puede servir como mecanismo de defensa por el cual los macrófagos que expresan la iNOS se protegen a sí mismos de niveles de •NO citotóxicos (Ratovitski et al., 1999b). La segunda era una proteína neuronal llamada kalirina, la cual parece jugar un papel de neuroprotección durante la inflamación del sistema nervioso central (Ratovitski et al., 1999a) ya que se asocia con la iNOS e inhibe su actividad enzimática al impedir la dimerización de la iNOS.

Otras proteínas que se ha descrito que interactúan con la iNOS son la caveolina-1, la cual es capaz de formar complejos con la iNOS en células de carcinoma de colon para promover su degradación vía proteasoma (Felley-Bosco et al., 2000). También interactúan con ella la caveolina-2 y 3; Hsp90 interacciona con la iNOS actuando como un efector alostérico positivo de la iNOS, modulando profundamente la producción de •NO (Yoshida y Xia, 2003). Las proteínas Rac-1 y Rac-2, que pertenecen a la familia Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) de GTPasas pequeñas tipo Rho, interactúan con la iNOS a través del dominio hemo-oxigenasa y esta interacción se correlaciona con una estimulación postraducciona de la actividad de la iNOS, sin variar los niveles de proteína, y probablemente con su redistribución espacial dentro de la célula (Kuncewicz et al., 2001).

Un mecanismo muy común de establecer interacciones proteína-proteína es a través de dominios tipo PDZ. Con frecuencia, estos dominios se localizan en la interfase de la membrana plasmática y el citoesqueleto y desde allí establecen importantes interacciones entre proteínas reguladoras y efectoras, lo cual ocurre de forma espacialmente localizada en las células polarizadas. Una de las características más interesantes de la iNOS es que sus aminoácidos carboxi-terminales se corresponden con un motivo de unión a dominios PDZ (Hung y Sheng, 2002). Se trata de un motivo de unión a PDZ de clase I: X-(S/T)-X-(V/L)-COOH, donde X es cualquier aminoácido. Interesantemente y a través de un proceso de *splicing* apenas comprendido, los aminoácidos finales de la iNOS de corazón humana -EPKGTRL (Adams et al., 1998) difieren de los encontrados en la iNOS humana de hepatocitos (Geller et al., 1993) y condrocitos (Charles et al., 1993): -LEMSAL. La iNOS de tejidos murinos presenta menos

heterogeneidad en esta región, mostrando la secuencia -PKGTRL en el caso de los hepatocitos de rata y la secuencia -PKATRL en macrófagos de ratón (Wood et al., 1993). Todas estas secuencias encajan en los motivos de clase I de unión a PDZ, si bien su variabilidad podría indicar que diferentes proteínas con dominios PDZ pueden interaccionar específicamente con la iNOS en diferentes tejidos, determinando así una localización subcelular particular.

Hace una década, la única proteína con dominios PDZ que se conocía que interaccionaba con el extremo C-terminal de la iNOS hepática era EBP50/NHERF-1 (*Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein of 50 kDa*) (Glynne et al., 2002), uno de los miembros de la familia NHERF (*Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factors*). En general, las proteínas NHERF regulan la transducción de señales bien a través de interacciones en las que están implicados sus dos dominios tipo PDZ capaces de unirse a diversas dianas proteicas o por interacción de su dominio de unión a ERM (*Ezrin-radixin-moesin*). Hasta la fecha se conocen más de 30 proteínas que se unen a EBP50. Tanto EBP50 (Weinman et al., 1995) como su proteína homóloga, NHERF-2 (también llamada E3KARP, SLP-1 y TKA-1), ambas con dos dominios PDZ en tándem, interaccionan con NHE3 (*Na⁺/H⁺ exchanger type 3*), un intercambiador de Na⁺/H⁺ localizado en la membrana de las microvellosidades intestinales y renales donde participa en la absorción transepitelial de Na⁺ y regulan su actividad (Stokka et al., 2010; Yun et al., 1997). El •NO producido por la iNOS puede modular procesos epiteliales polarizados como el transporte de solutos. Así, en células epiteliales humanas del túbulo proximal, la iNOS se localiza en el dominio apical dentro de un complejo proteico submembranoso unido fuertemente a la actina cortical, donde es capaz de interaccionar a través de sus cuatro aminoácidos C-terminales con el dominio PDZ1 de la proteína EBP50 que se localiza en la membrana apical de estas células polarizadas. Esta interacción EBP50-iNOS en la membrana apical parece ser necesaria para dirigir de un modo vectorial la producción del •NO hacia la superficie celular epitelial apical del túbulo proximal, facilitando la distribución hasta sus dianas, que incluyen transportadores apicales y proteínas como NHE3.

Posteriormente, nuestro grupo (Navarro-Lerida et al., 2007) describió cómo la iNOS es dirigida selectivamente a la membrana apical en múltiples tejidos. Por medio del ensayo de doble híbrido de levadura, se estableció que en corazón humano, el extremo C-terminal de la iNOS interacciona con el dominio PDZ1 de EBP50 con mayor afinidad a como lo hace su homólogo hepático. Además se descubrió la interacción de la iNOS con CAP70/NHERF-3 (*CFTR-Associated Protein of 70 kDa*), un miembro más de la familia NHERF que consta de 4 dominios PDZ y se expresa abundantemente en riñón, hígado, intestino delgado y ciertos epitelios (Wang et al., 2000b). La unión de la iNOS a CAP70 trae consigo la translocación al dominio apical de la célula. La unión tanto de EBP50 como de CAP70 recombinantes a la iNOS da lugar a un aumento en la población de dímeros activos de iNOS lo cual explica el aumento en la capacidad de síntesis de •NO que se observa. Adicionalmente, utilizando iRNA frente a CAP70 se anuló la secreción selectiva de •NO en el lado apical de células MDCK, quedando la

iNOS deslocalizada en el citosol celular, lo cual conlleva una clara alteración en los niveles de •NO que aparecen en el lado basolateral o apical de la célula (Navarro-Lerida et al., 2007).

Se ha demostrado que, en macrófagos, la inducción de la iNOS viene acompañada de la inducción de EBP50 (Davis et al., 2007). En este sistema, el extremo C-terminal de la iNOS se asocia también a los dominios PDZ de EBP50 de modo que la iNOS es transportada a regiones enriquecidas en actina, gracias al dominio ERM de EBP50. En macrófagos, este transporte viene directamente relacionado con la capacidad fagocítica ya que se sabe que los fagosomas/endosomas están muy enriquecidos en actina.

6. La familia de la Proteína Quinasa D.

La familia de la Proteína Quinasa D (PKD) está constituida por 3 isoformas; el primer miembro de esta familia, PKD1/PKC μ (PKD1 es el homólogo murino y PKC μ el humano), fue identificado en 1994 por los grupos de Rozengurt (Valverde et al., 1994) y Johannes (Johannes et al., 1994) de manera simultánea. Posteriormente se descubrieron dos nuevas isoformas, PKD2 (Sturany et al., 2001) y PKC ν /PKD3 (Hayashi et al., 1999).

Debido a su dominio C1, inicialmente PKC μ fue clasificada como una isoforma atípica dentro de la familia de la PKC (Johannes et al., 1994), pero enseguida se consideró una familia independiente ya que presentaba características diferentes (Valverde et al., 1994). Las propiedades estructurales y enzimáticas de PKD la diferencian de las isoformas de PKC (revisado en (Rozengurt et al., 2005)), por lo que PKD no fosforila varios de los sustratos establecidos de PKC (Valverde et al., 1994; Vanlint et al., 1995). De hecho, los miembros de la familia de PKD constituyen una familia de serina/treonina quinasas estimuladas por ésteres de forbol/diacilglicerol y se han clasificado como un subgrupo dentro de la superfamilia de las quinasas CAMK del quinoma humano (kinome: *the protein kinase complement of the human genome*), distinta de la rama AGC (nombrada así por PKA, PKG y PKC) que incluye las isoformas de PKC (Manning et al., 2002). Esta clasificación se basa en la estructura del dominio catalítico y en la especificidad de sustrato y PKD no está regulada por interacción directa con calcio/calmodulina; no obstante, el calcio puede regular la activación de PKD indirectamente debido a la producción alterada de diacilglicerol (DAG) (Kunkel et al., 2007). Su clasificación dentro de la rama de las quinasas CAMK se debe a su alto grado de homología con el dominio catalítico de MLCK (*Myosin light-chain kinase*) y el de CAMK (Valverde et al., 1994).

6.1. Estructura y dominios de las PKDs.

Las tres isoformas de la familia de PKD son homólogas y comparten una estructura en dominios común, mostrando un alto grado de similitud de secuencia, que supera el 90% en el caso del dominio catalítico (Rozengurt et al., 2005). Las regiones menos conservadas se sitúan entre los distintos dominios y se ha sugerido que puedan conferir funciones específicas a cada isoforma (Wang, 2006).

De forma general, las PKDs son serina/treonina quinasas que constan de un dominio N-terminal regulador, que contiene un motivo rico en cisteína (CRD) formado por dos dominios C1, un dominio de homología a pleckstrina (PH) y un dominio C-terminal catalítico con actividad quinasa (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994). Elementos del dominio regulador por un lado inhiben la actividad del dominio catalítico (por lo que la quinasa se mantiene en estado inactivo en condiciones basales) y también facilitan la asociación de PKD con la membrana plasmática y con membranas intracelulares (Rey y Rozengurt, 2001; Vanlint et al., 1995).

Más en detalle, las isoformas PKD1 y PKD2 y no así PKD3, contienen en su extremo N-terminal una región apolar rica en alaninas y prolinas (Figura 10). A continuación las tres isoformas cuentan con dos dominios C1 típicos (C1a y C1b) que juntos constituyen el dominio CRD. Los dominios C1 son unidades estructurales de unos 50 aminoácidos, cuya secuencia consenso es $HX_{12}CX_2CX_{13-14}CX_2CX_4HX_2CX_7C$ (H es His, C es Cys y X cualquier aminoácido) y que presentan una conformación globular compuesta por dos láminas β antiparalelas y una hélice α presente en el extremo C-terminal. Las dos láminas β forman un bolsillo donde se une el DAG, mientras que los aminoácidos Cys e His formarán dos sitios de unión para iones Zn^{2+} . Tras la interacción con sus ligandos, los dominios C1 exponen una superficie hidrofóbica que facilita la inserción en la membrana. Existen dominios C1 típicos que interaccionan con DAG y dominios C1 atípicos, que a pesar de tener la misma estructura y secuencia consenso, no pueden interaccionar con DAG ya que carecen de tres residuos necesarios para la unión del sustrato. Ambos tipos de dominios C1 pueden interaccionar con otras proteínas así como con fosfolípidos de membrana (revisado en (Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006)). El dominio CRD es responsable de la translocación a distintas membranas celulares (Matthews et al., 1999a) y regula de forma negativa la actividad catalítica de esta quinasa (Iglesias y Rozengurt, 1999). Existen diferencias funcionales entre los dos dominios C1 de PKD1 (Oancea et al., 2003). El dominio C1a presenta una mayor afinidad por DAG y es responsable de la localización de PKD1 en el aparato de Golgi (Maeda et al., 2001), mientras que el dominio C1b tiene una mayor afinidad por el PDBu (forbol-12,13-dibutirato) (Iglesias et al., 1998a), un análogo de DAG y está implicado en la translocación de PKD a la membrana plasmática (Matthews et al., 1999a) ya que puede unirse a las subunidades G α_q asociadas a esta membrana (Oancea et al., 2003). Además, el dominio C1b de PKD1 consta de una secuencia necesaria para su translocación al núcleo (Rey et al., 2001a). El dominio CRD presenta un alto grado de homología con los dominios encontrados en PKCs sensibles a DAG/ésteres de forbol y en otras proteínas de señalización reguladas por DAG, como miembros de las familias de las Quimerinas, de RasGRP (*Ras guanyl nucleotide releasing protein*), de Munc13 y de DAG quinasas (revisado en (Brose et al., 2004)).

A continuación en la secuencia aparece el dominio PH precedido de una región con carga negativa. Los dominios PH tienen capacidad para interaccionar con lípidos de membrana y proteínas, si bien en la familia de PKD sólo se ha descrito la interacción con proteínas, concretamente con las nuevas PKCs,

preferentemente con PKC η (Waldron et al., 1999b). Este dominio es necesario para la exportación de PKD1 del núcleo de manera dependiente de CRM-1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (Rey et al., 2001a) y también regula de forma negativa la actividad de PKD1. De hecho, mutaciones puntuales o deleciones del mismo conllevan que la enzima sea constitutivamente activa (Iglesias y Rozengurt, 1998).

En la mitad C-terminal se encuentra el dominio catalítico con actividad quinasa. La fosforilación de dos residuos localizados en una secuencia dentro del dominio catalítico conocida como “lazo de activación” es clave en la regulación de la actividad de la enzima. Estos dos residuos corresponden con las Ser744 y Ser748 en la PKD1 de ratón (Iglesias et al., 1998b; Waldron et al., 1999a). La mutación de ambos residuos de serina por alanina conlleva la resistencia a la activación tras la estimulación celular mientras que su sustitución por residuos de ácido glutámico (que mimetizan la fosforilación) genera una PKD constitutivamente activa. La mutación puntual de una u otra por Glu, da lugar a quinasas parcialmente activas. Ambas serinas resultan fosforiladas en mutantes de PKD deficientes en actividad quinasa, lo que indica que la activación de PKD, como se comentará más adelante, depende de la transfosforilación por otra quinasa anterior (PKC) y no se debe a una autofosforilación por PKD (Waldron et al., 2001). Aunque la fosforilación de otros residuos de serina (Iglesias et al., 1998b; Matthews et al., 1999b) y tirosina (Storz y Toker, 2003; Waldron et al., 2004) desempeña también un papel en la regulación de PKD, es la fosforilación de estas dos serinas la que es clave en su activación.

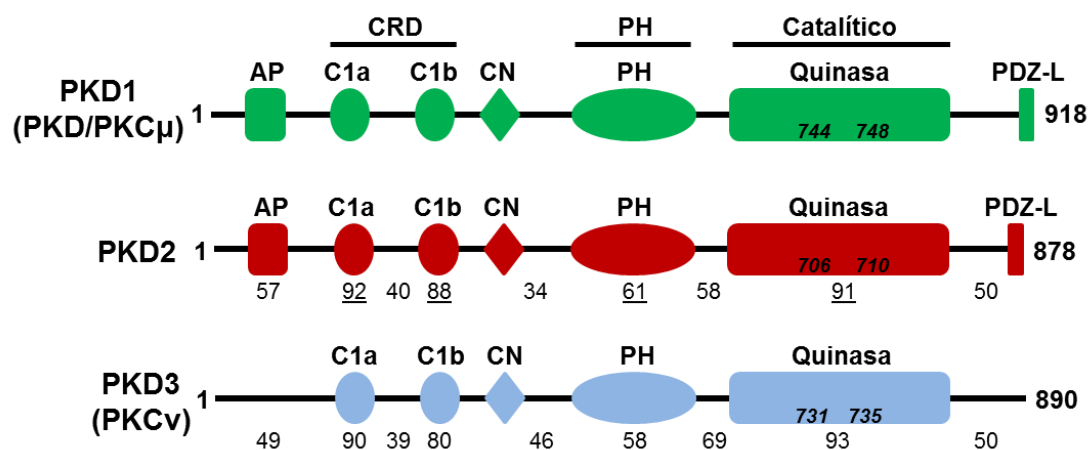


Figura 10: Representación esquemática de los tres miembros de la familia de la Proteína Quinasa D (PKD). AP representa una región apolar; el dominio rico en cisteínas (CRD) está constituido por dos dominios C1, C1a y C1b. Previo al dominio de homología a pleckstrina (PH), se encuentra una región con carga negativa (CN). A continuación se encuentra el dominio catalítico, con actividad serina/treonina quinasa. PKD1 y PKD2 presentan en su extremo C-terminal un motivo de unión a dominios PDZ (PDZ-L). Las secuencias corresponden a ratón. Los residuos de serina dentro del lazo de activación que son fosforilados vía nuevas PKCs se muestran en itálica. Los números situados bajo los esquemas de PKD2 y PKD3 corresponden al porcentaje de homología de los dominios estructurales (subrayados) o regiones no estructurales con respecto a PKD1 (Rozengurt et al., 2005).

El grupo de la Dra. T. Iglesias descubrió que el extremo C-terminal de PKD1 y PKD2, pero no el de PKD3, constituye un motivo de interacción con dominios PDZ de tipo I, PDZ-L (-VSIL, en PKD1 e -ISVL en PKD2) (Sanchez-Ruiloba et al., 2006). La activación de PKD por efectores anteriores en la cascada de

señalización (como la PKC) conlleva la autofosforilación de PKD1 en la Ser916 localizada en esta secuencia C-terminal y la aparición de una carga negativa en esta posición (Matthews et al., 1999b; Sanchez-Ruiloba et al., 2006). Por ejemplo, PKD1 no sólo co-inmunoprecipita con Kidins220 (Iglesias et al., 2000) sino que también controla el tráfico y la localización de Kidins220 en la membrana plasmática neuronal a través de este motivo de manera dependiente de la autofosforilación (Sanchez-Ruiloba et al., 2006).

6.2. Mecanismos celulares de activación de las PKDs.

La activación de PKD1 puede desencadenarse por diversas vías (Figura 11). La principal es la que implica a la familia de la PKC y al segundo mensajero lipídico DAG. Así, cuando un ligando extracelular, por ejemplo un factor de crecimiento como el VEGF (Wong y Jin, 2005) o un agonista de receptores acoplados a proteínas G (Zhukova et al., 2001a), interacciona con su receptor en la membrana plasmática, se activa la fosfolipasa C (PLC) (β o γ) que hidroliza el PIP_2 en IP_3 y DAG. El DAG provoca la translocación de PKD1, a través de su dominio C1b, a la membrana plasmática donde también se translocarán determinadas isoformas de PKC, que una vez activas fosforilarán a PKD1 en su lazo de activación del dominio catalítico, alcanzando así su estado activado (Waldron et al., 1999a; Waldron et al., 2001). La fosforilación de PKD1 impide que el dominio PH interaccione con el dominio catalítico, eliminando así la regulación negativa que ejerce sobre la actividad quinasa (Waldron y Rozengurt, 2003). La translocación de PKD1 a la membrana plasmática es transitoria e independiente de su activación (Matthews et al., 1999a), por lo que aún en su estado activo puede volver al citosol y pasar al núcleo promoviendo la propagación de señales desde la membrana plasmática a distintos compartimentos intracelulares (Matthews et al., 2000; Rey et al., 2001b).

Varios de los miembros de la familia de PKC pueden activar a PKD1 y aunque preferentemente lo hacen las nuevas (PKC δ , ϵ , η , θ), también se ha descrito la activación por la isoforma clásica, PKC α (Wong y Jin, 2005). Según el tipo celular y el estímulo que reciba la célula, actuará una u otra isoforma de PKC (Brandlin et al., 2002; Storz et al., 2004b; Waldron y Rozengurt, 2003; Yuan et al., 2002). PKD2 y PKD3 también pueden activarse por esta vía (Matthews et al., 2003; Sturany et al., 2002). En definitiva, diversos estudios indican que la activación de PKD de forma dependiente de PKC, se puede llevar a cabo en respuesta a péptidos reguladores como bombesina, bradiquinina, endotelina, vasopresina, neurotensina (Chiu y Rozengurt, 2001a, b; Chiu et al., 2002; Guha et al., 2002; Sinnett-Smith et al., 2004; Zhukova et al., 2001a; Zhukova et al., 2001b; Zugaza et al., 1997), a ácido lisofosfatídico (LPA) (Chiu y Rozengurt, 2001b) y trombina (Stafford et al., 2003), que actúan a través de Gq, G_{12} , Gi y Rho (Chiu y Rozengurt, 2001b; Paolucci et al., 2000; Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2003; Yuan et al., 2001), a factores de crecimiento como PDGF (*Platelet-derived growth factor*) (Zugaza et al., 1997), el VEGF (Wong y Jin, 2005) e IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) (Qiang et al., 2004), entre otros muchos

estímulos.

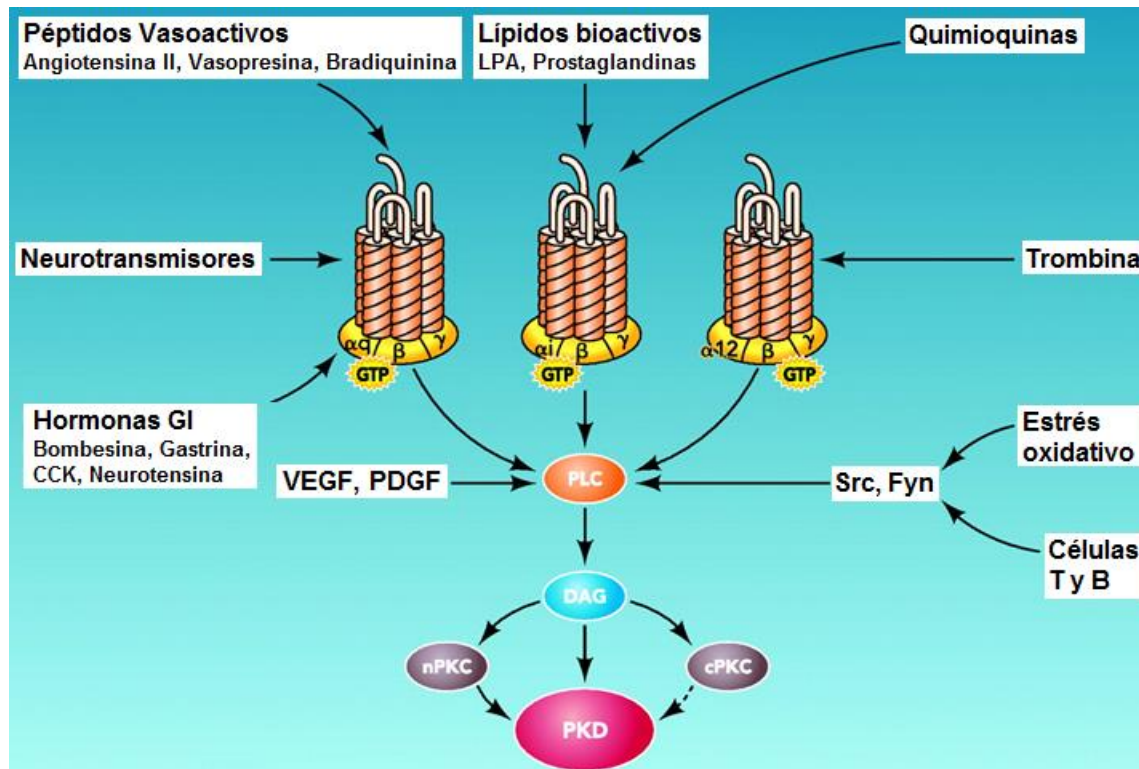


Figura 11. Activación de PKDs por múltiples estímulos. Diversas hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, quimioquinas, lípidos bioactivos, proteasas y estrés oxidativo inducen la hidrólisis del PIP₂ mediada por PLC para producir DAG en la membrana plasmática, lo que conduce a la translocación de la PKD inactiva desde el citosol hasta la misma. El DAG también recluta a la membrana plasmática y simultáneamente activa a las nuevas PKCs, que median la fosforilación de PKD1 en las serinas 744 y 748 (en PKD1 murina). El DAG y la fosforilación mediada por PKC actúan sinérgicamente para promover la activación catalítica de PKD. Figura adaptada de (Rozengurt, 2011).

Sin embargo, PKD1 también se puede activar por otros mecanismos. Por ejemplo, en condiciones de estrés oxidativo la PKD1 se puede activar de forma independiente de DAG (Waldron y Rozengurt, 2000). Por otro lado, el peróxido de hidrógeno o el pervanadato desencadenan la activación de la vía de las tirosinas quinasas Src-Abl. Una vez activa, Abl puede fosforilar a PKD1 en la Tyr463 situada en el dominio PH (Storz et al., 2003), lo que implica un cambio conformacional que facilita su posterior fosforilación en la Tyr95 por Src (Doppler y Storz, 2007), situada entre la región apolar y el dominio C1a y que forma parte de una secuencia consenso de interacción con dominios C2 presente en PKD1 y PKD2, pero no en PKD3. En estas condiciones, a través de la vía Src-Abl también se activa PKCδ (Sun et al., 2000), que tiene un dominio C2 a través del que interacciona con la secuencia consenso previamente fosforilada de PKD1. Así, PKCδ puede fosforilar a PKD1 en su lazo de activación, con lo que alcanza su máxima activación (Doppler y Storz, 2007; Storz et al., 2004b; Storz y Toker, 2003). PKD2 se puede activar por esta vía pero no PKD3.

Las subunidades βγ de la proteína G pueden activar a PKD1 directamente mediante la interacción con su dominio PH (Jamora et al., 1999). PKD1 también se puede activar de forma independiente de

DAG y de las PKCs en condiciones de inducción de apoptosis por daño genotóxico (Endo et al., 2000).

Las PKDs son serina/treonina quinasas. PKD1 fosforila una Ser o una Thr dentro de una secuencia consenso que presenta una Leu en posición (-5) y una Arg en posición (-3) (Doppler et al., 2005). Son numerosos los sustratos descritos de PKD; así al primer sustrato fisiológico descrito para esta quinasa, Kidins220 (*Kinase D interacting substrate of 220 kDa*) (Iglesias et al., 2000), se han unido una larga lista de proteínas implicadas en diferentes funciones celulares: c-Jun (Hurd et al., 2002), RIN1 (*Ras interaction/interference 1*) (Wang et al., 2002), las histonas deacetilasas de tipo II (HDAC5 y 7) (Dequiedt et al., 2005; Vega et al., 2004), E-cadherina (Jaggi et al., 2005), la fosfatidil-inositol-4 quinasa III β (PI4KIII β) (Hausser et al., 2005), el factor de transcripción CREB (*Cyclic AMP-response element-binding*) (Johannessen et al., 2007) y otros muchos más que se irán comentando más adelante.

6.3. Distribución subcelular de las PKDs.

En células no estimuladas, PKD1 se localiza en el citosol (Matthews et al., 1999a; Matthews et al., 2000; Rey et al., 2001a; Rey et al., 2001b) y en menor medida en diversos compartimentos intracelulares como el Golgi y mitocondrias (Cowell et al., 2009; Hausser et al., 2002; Liljedahl et al., 2001), pero tras su activación se transloca rápidamente desde el citosol hacia diferentes compartimentos subcelulares (Matthews et al., 1999a; Matthews et al., 2000; Rey et al., 2001a; Rey et al., 2001b; Rey et al., 2003c). Cada etapa de la translocación está asociada con un dominio particular de PKD1 e implica interacciones rápidas y reversibles. El primer paso de la translocación de PKD1 está mediado por el dominio C1b del dominio CRD, que une el DAG producido en la cara interna de la membrana plasmática tras la estimulación de PLC (Rey et al., 2001b). También se ha descrito que este dominio C1b y secuencias flanqueantes pueden unirse directamente a G α_q (Oancea et al., 2003). Por el contrario el dominio C1a recluta a PKD1 al aparato de Golgi (Maeda et al., 2001). La segunda etapa, la translocación reversible desde la membrana plasmática al citosol, requiere la fosforilación de PKD1 en el lazo de activación, en las serinas 744 y 748, dependiente de PKC (Rey et al., 2001b). A continuación, la PKD1 fosforilada se transloca, vía su dominio C1b, al núcleo, donde se acumula transitoriamente antes de ser exportada al citosol gracias a una vía de exportación nuclear dependiente de CRM-1 que requiere la participación del dominio PH de PKD1 (Rey et al., 2001a).

En las células B y en mastocitos, la unión del antígeno al receptor induce una rápida translocación de PKD1 desde el citosol a la membrana plasmática (Matthews et al., 1999a; Matthews et al., 2000). Esta translocación es reversible y no parece que implique el compartimento nuclear (Matthews et al., 2000). Así pues, además de los determinantes estructurales presentes en PKD1, otros factores como el contexto celular, estímulos y proteínas de andamiaje influyen en su distribución subcelular.

PKD2 también sufre una translocación reversible desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación de GPCRs (*G protein-coupled receptors*) (Rey et al., 2003a) y la

translocación reversa requiere como en el caso de PKD1, la actividad de PKC. Sin embargo, a diferencia de PKD1, la PKD2 activa permanece predominantemente en el citoplasma tras su disociación de la membrana plasmática.

En células no estimuladas, a diferencia de PKD1 y PKD2 que son predominantemente citoplásmicas, PKD3 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Rey et al., 2003b). Estímulos que incluyen agonistas de GPCRs (por ejemplo neurotensina) y la unión antígeno-receptor en células B, inducen una rápida y reversible translocación de PKD3 a la membrana plasmática, que es dependiente de PKC (Matthews et al., 2003; Rey et al., 2003b). Al igual que en el caso de PKD1, pero contrariamente a lo que ocurre con PKD2, la activación del GPRC aumenta la tasa de entrada de PKD3 en el núcleo (Rey et al., 2006; Rey et al., 2003b).

Las diferencias en la distribución intracelular de las tres isoformas de PKD puede conferir la capacidad de ejercer múltiples funciones en distintas localizaciones subcelulares y generar así diversas respuestas fisiológicas.

El modelo propuesto que engloba la regulación de la actividad y la distribución intracelular de PKD1 en respuesta a una rápida generación de DAG en la membrana plasmática (Rozengurt et al., 2005), implica que en células no estimuladas, PKD1 se encuentra en un estado de muy baja actividad quinasa mantenido gracias a la represión ejercida por los dominios CRD y PH. En este estado, la distribución de PKD1 principalmente en el citosol se debe a una mayor tasa de exportación nuclear con respecto a su importación al núcleo. La producción de DAG induce la translocación de PKD1 a la membrana plasmática mediada por el dominio CRD, donde las nuevas PKCs son también recluidas en respuesta a la generación de DAG. Estas nuevas PKCs, activadas alostéricamente por DAG, transfosforilan PKD1 en las Ser744 y 748, estabilizando así el lazo de activación de PKD1 en una conformación activa. La PKD1 fosforilada y activa, se disocia de la membrana plasmática, se transloca al citosol y a continuación entra en el núcleo, donde se acumula transitoriamente hasta su retorno al citoplasma, volviendo así al estado basal.

Un modelo similar puede explicar la regulación de la actividad catalítica y la distribución intracelular de PKD2 y PKD3 en respuesta a la generación de DAG por un agonista.

La distribución basal de cada una de las isoformas entre el citosol y el núcleo depende de sus respectivas tasas de importación y exportación nuclear.

Estudios más recientes han mostrado que la rápida activación de PKD1 dependiente de PKC es seguida por una fase de activación catalítica y fosforilación sostenida independiente de PKC inducida mediante estimulación con agonistas de receptores acoplados a Gq (como bombesina y vasopresina) (Jacamo et al., 2008; Sinnott-Smith et al., 2009). Estos estudios en células estimuladas con agonistas de GPCRs, muestran que PKD1 es un ejemplo de una proteína quinasa en la que cada residuo del lazo de activación es regulado preferentemente por mecanismos diferentes, denominados transfosforilación para

la Ser744 y autofosforilación para la Ser748. La fosforilación dependiente de PKC en las Ser744/748 del lazo de activación es el principal mecanismo implicado en la fase temprana de activación de PKD, mientras que la autofosforilación de PKD en la Ser748 es el principal mecanismo que contribuye a la fase tardía de activación de PKD en células estimuladas con agonistas de GPCRs (Jacamo et al., 2008; Sinnett-Smith et al., 2009).

6.4. Funciones de las PKDs.

PKD1, el miembro más estudiado de esta familia, está implicado en la regulación de un complejo conjunto de procesos biológicos fundamentales en diferentes tipos celulares y tejidos, desde funciones celulares primarias como el control de la organización del Golgi, tráfico de proteínas y secreción, tráfico de membranas, polaridad, adhesión y migración, proliferación y diferenciación, supervivencia y muerte, hasta procesos complejos como regulación inmune, hipertrofia y contracción cardíaca, angiogénesis y cáncer (Rozengurt, 2011). PKD media tal diversidad de funciones biológicas normales y anormales debido en parte a cambios dinámicos en su localización espacial y temporal, combinado con su marcada especificidad de sustrato.

Como se ha comentado, los miembros de la familia de PKD sufren rápidas redistribuciones en respuesta a la estimulación celular. PKD1 y PKD2 se translocan del citosol a microentornos de la membrana plasmática que contienen DAG (Rey et al., 2001b) seguido de la translocación reversa de PKD, dependiente de PKC, desde la membrana plasmática al citosol y la subsiguiente acumulación en el núcleo (Rey et al., 2001a). En cambio, PKD3 está continuamente transportándose entre el núcleo y el citoplasma (Rey et al., 2006; Rey et al., 2003b). Pero además encontramos acumulaciones de PKD en el Golgi (Liljedahl et al., 2001; Yeaman et al., 2004) y en mitocondrias (Cowell et al., 2009). A esto hay que sumar que tanto PKD1 como PKD2 tiene en su extremo C-terminal un motivo de unión a dominios PDZ (Sanchez-Ruiloba et al., 2006), que interacciona por ejemplo con Kidins220 (Iglesias et al., 2000; Sanchez-Ruiloba et al., 2006) o con el primer dominio PDZ de NHERF-1 (Kunkel et al., 2009). De esta forma, las distintas isoformas de PKD pueden regular dianas en una gran variedad de localizaciones subcelulares y consiguientemente controlar múltiples actividades celulares.

La señalización mediada por PKD se ha implicado en proliferación celular y diferenciación. En fibroblastos, PKD1 se puede activar por múltiples agonistas de GPCRs promotores del crecimiento que actúan a través de Gq, G₁₂, Gi (Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2003; Yuan et al., 2001; Zugaza et al., 1997), lo que sugiere que las funciones de PKD median en señalización mitogénica (Rozengurt et al., 2005). De hecho, la sobreexpresión de PKD1 o PKD2 potencia la síntesis de DNA y la proliferación celular inducida por agonistas de receptores acoplados a Gq en fibroblastos Swiss3t3 (Sinnett-Smith et al., 2009; Sinnett-Smith et al., 2004; Sinnett-Smith et al., 2007; Zhukova et al., 2001a) y por el contrario, la depleción de PKD1 mediante la transfección de estas células con siRNAs frente a PKD1 disminuye la

mitogénesis inducida por GPCR (Sinnott-Smith et al., 2009). Así pues la activación catalítica de PKD1 juega un papel crítico y selectivo en señalización mitogénica a través de GPCRs.

Se ha descrito la implicación de PKD en la proliferación de células endoteliales, migración y angiogénesis. Los distintos tipos de VEGFs y sus receptores tirosina quinasa de endotelio desempeñan un papel central en la regulación del desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos y son esenciales para la angiogénesis tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas. La señalización vía PKD es necesaria para la expresión/secreción de VEGF por células tumorales (Azoitei et al., 2010; Ochi et al., 2011) y la activación de ERK, para la expresión génica y para la síntesis de DNA en células endoteliales estimuladas por VEGF (Wong y Jin, 2005). Así, en células endoteliales, VEGF activa PKD vía la cascada de señalización VEGFR2/PLC γ /PKC α y PKD desempeña un papel clave en la señalización de ERK inducida por VEGF y en la proliferación de células endoteliales (Wong y Jin, 2005). Posteriormente se ha descrito que PKD2, que se expresa en células endoteliales primarias humanas de diferentes tejidos y es una isoforma de PKD importante en la mediación de la fosforilación de sustratos de PKD en células endoteliales, desempeña un papel esencial en la proliferación de células endoteliales y la migración necesaria para la angiogénesis al menos en parte a través de la modulación de la expresión de VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor-2*) y FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor-1*), dos receptores de factores de crecimiento claves implicados en angiogénesis (Hao et al., 2009).

La acetilación/desacetilación de histonas es un mecanismo fundamental para el control de la expresión génica. Las histonas deacetilasas de clase II (HDACs 4, 5, 7 y 9) regulan la estructura de la cromatina mediante la interacción con diversos factores de transcripción para reprimir su actividad. PKD fosforila residuos específicos en las HDACs de clase II, lo que conduce a su asociación con proteínas 14-3-3 en células endoteliales y otros tipos celulares. El secuestro de HDACs en el citoplasma vía la formación del complejo 14-3-3, libera genes diana en el núcleo de la acción represiva de HDAC con lo que se facilita la expresión de los mismos. Por ejemplo, HDAC7 se ha implicado en la regulación de la morfología de las células endoteliales, migración y capacidad para formar estructuras similares a capilares *in vitro* (Mottet et al., 2007). La salida del núcleo de HDAC7 es inducida por VEGF a través de la fosforilación de las serinas mediada por PKD de forma que, HDAC7 es secuestrada por 14-3-3 y exportada del núcleo con lo que se activa la expresión de los genes inducidos por VEGF en las células endoteliales (Ha et al., 2008a; Mottet et al., 2007; Wang et al., 2008). También HDAC5 se ha identificado como un regulador negativo de la angiogénesis (Urbich et al., 2009). El VEGF, de forma dependiente de PKD, también estimula la fosforilación de HDAC5 en las Ser259 y 498, lo que conduce a la exclusión nuclear de HDAC5 y la consiguiente activación transcripcional (Ha et al., 2008b). Así pues, el complejo programa de expresión génica y migración desencadenado por VEGF en células endoteliales que conduce a angiogénesis es orquestado, al menos en parte, por la fosforilación de HDAC5 y HDAC7 mediada por PKD, que conduce a su exclusión del núcleo en estas células, lo que convierte a PKD en

una atractiva diana para terapia antiangiogénica.

A PKD también se le ha asignado un papel en el proceso de diferenciación de osteoblastos. Las proteínas BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia de TGF- β (*Transforming growth factor beta*). Contribuyen a la formación del hueso y tejidos conectivos mediante la inducción de la diferenciación de células mesenquimales en células formadoras de hueso. Estudios realizados han demostrado que BMP-2 induce la activación de PKD a través de una vía independiente de PKC durante la progresión del linaje de osteoblastos (Lemonnier et al., 2004) y que PKD es necesaria para los efectos de BMP-2 en la diferenciación de osteoblastos (Celil y Campbell, 2005). BMP-2 induce la exportación de HDAC7 del núcleo en células mesenquimales, la cual está asociada con el aumento de la fosforilación de HDAC7 y la unión de 14-3-3 (Jensen et al., 2009). HDAC7 reprime la actividad de Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*), un regulador transcripcional maestro de la biología del esqueleto. PKD1 induce la exportación nuclear de HDAC7 con lo que alivia la represión transcripcional mediada por Runx2 (Jensen et al., 2009). Aunque puedan estar implicadas otras vías, existe pues un mecanismo por el que la señalización de BMP-2 regula la actividad de Runx2 vía la inhibición dependiente de PKD de la represión transcripcional ejercida por HDAC7.

Además, en células nerviosas PKD1 y PKD2 se han implicado recientemente en diversas funciones neuronales como la formación de axones, clasificación de proteínas dendríticas y arborización dendrítica (Bisbal et al., 2008; Czondor et al., 2009; Yin et al., 2008), con lo que desempeñan un papel en el establecimiento de la polaridad neuronal, así como en la señalización por glutamato a través del grupo I de receptores metabotrópicos (Krueger et al., 2010).

En células epiteliales polarizadas, PKD1 y PKD2, pero no PKD3, regulan específicamente la producción de vesículas desde el TGN (Red trans-Golgi) destinadas a la membrana basolateral más que a la membrana apical, por lo que estos miembros de la familia de PKD pueden desempeñar un papel importante en la generación de la polaridad epitelial (Yeaman et al., 2004).

Es interesante como, PKD regula el aprendizaje y el comportamiento en *C. elegans*, integrando información externa en células epiteliales intestinales y neuronales (Fu et al., 2009).

PKD también está implicada en procesos de inflamación y estrés oxidativo. NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) es un factor de transcripción clave que es activado por múltiples receptores y regula la expresión de una gran variedad de proteínas que controlan la inmunidad innata y adaptativa. Numerosos estudios indican que PKD es un mediador de la inducción de NF- κ B en una gran variedad de células expuestas a agonistas de GPCRs o estrés oxidativo (Chiu et al., 2007; Mihailovic et al., 2004; Song et al., 2009; Storz et al., 2004a, b; Storz y Toker, 2003). La estimulación de células epiteliales de colon humanas NCM4650 con LPA, un lípido bioactivo el agonista de GPCRs, conduce a una rápida y notable activación de PKD2, la principal isoforma expresada en estas células (Chiu et al., 2007). El LPA estimula

la producción de interleuquina 8, un potente quimioquina pro-inflamatoria y estimula la activación de NF- κ B.

Asimismo, PKD actúa como mediador de la hipertrofia cardíaca, una condición asociada con elevado riesgo para el desarrollo de fallo cardíaco. PKD directamente fosforila HDAC5, una enzima que suprime la hipertrofia cardíaca (Vega et al., 2004).

Dado el amplio papel de PKD en la transducción de señales, migración, secreción, expresión génica, diferenciación y proliferación no es de extrañar que la señalización mediada por PKD haya sido implicada en una gran variedad de células cancerosas de distinto origen. Además de promover directamente la proliferación de células cancerosas, también se ha implicado en la regulación de diversos aspectos del microentorno del tumor, incluyendo angiogénesis, inflamación e inducción de COX-2 (*Cyclooxygenase-2*) (Yoo et al., 2009). Un reciente estudio ha identificado una mutación recurrente en el gen *PRKD1* que codifica para PKD1 en los cánceres de mama y colon humanos (Kan et al., 2010).



OBJETIVOS

Las Óxido Nítrico Sintetasas (NOSs) son enzimas complejas altamente reguladas, y su actividad y por tanto la producción de •NO, está sujeta a una amplia variedad de controles transcripcionales, traduccionales y postraduccionales.

En este bloque de la tesis se ha profundizado en el estudio del papel que desempeña el módulo carboxi-terminal de cada una de las isoformas de las NOS en la regulación de la síntesis de •NO.

1. Óxido nítrico sintasa endotelial

Un primer objetivo fue examinar si la eNOS era un nuevo sustrato de la proteína quinasa D (PKD), y si tal fuera el caso, estudiar el papel de esta fosforilación.

Los distintos factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGFs) y sus receptores tirosina quinasa de endotelio desempeñan un papel central en la regulación del desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos, y son esenciales para la angiogénesis tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas. La lectura de dos artículos nos puso sobre la pista de que la eNOS pudiera ser un sustrato de PKD. El primero de Wong y colaboradores (Wong y Jin, 2005) en el que describían que en células endoteliales VEGF activa PKD vía la cascada de señalización VEGFR2/PLCγ/PKCα y PKD desempeña un papel clave en la señalización de ERK inducida por VEGF y en la proliferación de células endoteliales. El segundo de Hao y colaboradores (Hao et al., 2009) en el que describen que PKD2 desempeña un papel esencial en la proliferación de células endoteliales y la migración necesaria para la angiogénesis al menos en parte a través de la modulación de la expresión de VEGFR2 y FGFR1, dos receptores de factores de crecimiento claves implicados en angiogénesis y donde emplean un anticuerpo comercial que reconoce sustratos de PKD fosforilados en un lisado de células endoteliales HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*), y observan una banda de 130 kDa que corresponde a un sustrato de PKD fosforilado. Todo ello nos hizo sospechar que dicha banda fosforilada por PKD en células endoteliales fuera la eNOS de forma que PKD regulara la actividad de eNOS y la síntesis de •NO, de modo que la implicación de PKD en la proliferación de células endoteliales, migración y angiogénesis se llevara a cabo, al menos en parte, a través de la activación de su sustrato eNOS.

Los objetivos que nos planteamos en esta parte del primer bloque de la tesis fueron:

- Determinar si la eNOS es un nuevo sustrato de PKD tanto *in vitro* como *in vivo*, y por lo tanto si PKD fosforila a la eNOS en el residuo de serina conservado (Ser1179 de la eNOS bovina) presente en el motivo carboxi-terminal que constituye un lazo autoinhibitorio.
- Determinar si dicha fosforilación mediada por PKD es activadora y por lo tanto conduce a un aumento de los niveles de •NO producidos.
- Estudiar si existe una interacción entre PKD y eNOS, y en su caso determinar qué dominios de ambas proteínas median dicha interacción.

- Determinar si en células endoteliales un estímulo celular como el VEGF o el tratamiento con el éster de forbol PDBu, un potente activador de PKD, induce la fosforilación de la eNOS endógena en la Ser1179 por PKD endógena, a distintos tiempos de incubación.
- Determinar mediante inmunofluorescencia la localización subcelular de la eNOS endógena y de PKD1/2 sobreexpresadas en células endoteliales BAEC tras el tratamiento con VEGF o con PDBu.
- Estudiar el papel de PKD en la migración de células endoteliales BAEC, una importante etapa en la angiogénesis, mediante un ensayo de reparación de herida (*wound healing*). Valorar la capacidad de migración de las células endoteliales BAEC inducida por VEGF o por PDBu, en presencia o no de inhibidores específicos de eNOS o de PKD.

2. Óxido nítrico sintasa neuronal

El segundo apartado de este primer bloque de la tesis se ha centrado en la isoforma neuronal nNOS. El extremo C-terminal de PKD1 constituye un motivo de unión a dominios PDZ. Inicialmente se proponía un modelo en el que la carga negativa del fosfato incorporado en la Ser916 cuando la PKD1 es activa, podría mimetizar un residuo ácido, impidiendo de esta forma la interacción con dominios PDZ capaces de interaccionar con el motivo de clase I no fosforilado (Sanchez-Ruiloba et al., 2006), pero este cambio podría favorecer la interacción de PKD1 activa con otros dominios PDZ que tuvieran distintas afinidades o propiedades como es el caso de dominio PDZ de la nNOS. Además, dado que en neuronas tanto nNOS como PKD1/2 se asocian a NMDAR por interacciones mediadas por dominios PDZ se estudió si la activación de PKD1 conllevaba una interacción directa con nNOS y si nNOS podía ser sustrato de PKD1.

Los objetivos que nos planteamos en esta segunda parte del primer bloque de la tesis fueron:

- Comprobar si la activación de PKD1 conllevaba una interacción directa con nNOS, interacción mediada por el motivo de unión a PDZ fosforilado de PKD1 activa y el dominio PDZ de la nNOS.
- Determinar si la nNOS es un nuevo sustrato de PKD tanto *in vitro* como *in vivo*, y por lo tanto si la PKD fosforila a la nNOS en el residuo de serina conservado (Ser11412 de la nNOS de rata) presente en el motivo carboxi-terminal que constituye un lazo autoinhibitorio.
- Estudiar si existe una interacción entre PKD y nNOS, y determinar qué dominios de la PKD median dicha interacción.
- Determinar mediante inmunofluorescencia la localización subcelular de la nNOS y de PKD1 sobreexpresadas en células HEK293T y en células PC12 tras el tratamiento con PDBu.

3. Óxido nítrico sintasa inducible

El extremo C-terminal de la iNOS, a diferencia de las isoformas constitutivas, no presenta este

residuo de serina fosforilable conservado, pero estudios de delección de este módulo carboxilo-terminal han mostrado que esta región está también limitando la transferencia de electrones y por esta razón regulando la actividad de liberación de •NO por la iNOS. En cambio, la iNOS tiene una secuencia consenso de unión a dominios PDZ en su extremo C-terminal que interacciona con proteínas de la familia NHERF, que constan de varios dominios PDZ. Esta interacción tiene un doble papel: la translocación de la iNOS al dominio apical de la célula epitelial polarizada, de forma que se dirige la producción del •NO de un modo vectorial hacia la superficie celular epitelial apical del túbulo proximal, y el aumento en la población de dímeros activos de iNOS que justifica aumento en la capacidad de síntesis de •NO que se observa.

Los objetivos que nos planteamos en esta tercera parte del primer bloque de la tesis fueron:

- Profundizar en el estudio de la regulación de la actividad de la iNOS desempeñada por este módulo carboxi-terminal a través de la delección progresiva del mismo: $\Delta 5$, $\Delta 10$, $\Delta 15$.
- Profundizar en el estudio de la regulación de la actividad de la iNOS desempeñada por este módulo carboxi-terminal por interacción con dos miembros de la familia NHERF: EBP50 y CAP70.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

1. Reactivos de uso general.

Los tampones, oligonucleótidos, y reactivos comunes de laboratorio se obtuvieron de Sigma-Aldrich salvo excepciones señaladas. La polimerasa Pfu, la T4 DNA ligasa, las enzimas de restricción y los marcadores de masa molecular se obtuvieron de Fermentas. Glutamina, antibióticos (penicilina y estreptomycin), medio de cultivo de células de mamífero DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), forbol-12,13-dibutirato (PDBu), VEGF, Gö6976 (G1171), tricinirina (T3830), inhibidor Akt1/2 quinasa (A6730), 8-Br-cGMP, ionóforo de calcio A23187, (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina dihidroclorada (BH4), flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD), 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF2-DA), BSA, NADPH, citocromo c, catalasa, L-NG-nitroarginina metil éster (L-NAME), ácido sulfanílico, NEDA (N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorado), ATP, DAPI, proteína A-Sepharosa, ácido adenílico (2',3'-ADP), DNA de cadena simple de esperma de salmón para hibridación, y el X-β-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), fueron obtenidos de Sigma. Las resinas Ni-NTA agarosa (Qiagen), 2',5'-ADP-Agarosa (Sigma), Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) y Glutathion-Sepharosa (Amersham). La D(+)-lactosa monohidrato de Scharlau. Los aminoácidos L-Arg, L-His, L-Lys y L-Leu se obtuvieron de Calbiochem-Merck Bioscience. La tripsina-EDTA y el suero bovino fetal (FBS), fueron de Bio Whittaker Europe. El medio de cultivo base de nitrógeno de levaduras (YNB) sin aminoácidos fue de BD Clontech. El 3-aminotriazol (3-AT) y la lisozima de gallina, de Fluka. Los filtros estériles empleados para los ensayos de β-galactosidasa de levaduras, se obtuvieron de Whatman. La membrana de inmunodetección de nitrocelulosa Hybond-ECL de Amersham, los reactivos de ECL de Pierce. Los inhibidores de fosfatasa fueron PMSF (Sigma), leupeptina (Roche) y aprotinina (Bachem). Los inhibidores de fosfatasa PhosSTOP fueron de Roche. La solución de montaje fue de Dako.

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-eNOS, anti-eNOS-pSer¹¹⁷⁷ (Ser1177 en la eNOS humana) y anti-EBP50 se obtuvieron de BD Transduction Laboratories. Los anticuerpos monoclonales de ratón frente a VASP total y PKD2, y los policlonales de conejo anti-VASP-pSer²³⁹, anti-PKCμ (reconoce PKD 1/2) y anti-PKCμ-pSer⁹¹⁰ fueron de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo monoclonal anti-tubulina fue de Sigma. Los sueros policlonales anti-eNOS, anti-nNOS y anti-GFP, fueron obtenidos para nuestro laboratorio usando las respectivas proteínas recombinantes como inmunógeno tras su inyección en conejos. El anticuerpo policlonal de conejo anti-nNOS-fosfo-Ser¹⁴¹² se obtuvo de Upstate-Merck Millipore. Los anticuerpos monoclonales anti-myc y anti-GST se obtuvieron de Cell Signalling Technology. Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano fueron de Sigma. El anticuerpo secundario marcado con Cy3, fue de Sigma.

2. Líneas celulares.

2.1. Células de mamífero.

BAEC (endoteliales de arteria de vaca): obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio a partir de aortas de vaca suministradas por el matadero de Pozuelo de Alarcón (Madrid).

COS-7 (epiteliales de riñón de mono): regalo del Dr. M. A. Alonso (CBM, Madrid).

HEK293T (células de riñón embrionarias humanas): proporcionadas por la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols).

2.2. Bacterias.

DH5αF': F'endA1 hsdR17 (r-k,m+k) supE441- thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR [Φ80 dlac Δ (lacZ) M15]. Cepa de *E. coli* utilizada para la clonación de los distintos DNAs.

BL21(DE3): F'-ompT[lon]hsdSB(r-b,m-b)gal[dcn]con DE3, profago 1 que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7 y el lisógeno del fago λ DE3 (T7 RNA polimerasa). Cepa de *E. coli* deficiente en las proteasas lon y ompT. Se empleó para la expresión de las proteínas recombinantes.

2.3. Levaduras.

Y190: fueron un regalo del Dr. Iván Ventoso (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). Cepa de *Sacharomices cerevisiae* empleada en los estudios de interacciones proteína-proteína por el sistema de doble híbrido de levadura.

3. Medios de cultivo

3.1. Células de mamífero

Las células HEK293T y COS-7 fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 u/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomycin y 2 mM L-glutamina en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%, a 37°C.

Las células BAEC fueron crecidas en las mismas condiciones pero con un 20% de suero fetal bovino.

Para despegar las células adherentes de la superficie de crecimiento, proceso conocido como tripsinización, se utilizó una solución con tripsina al 0.05% y EDTA al 0.02%.

Las células tratadas o transfectadas con las distintas construcciones fueron analizadas entre 24-48 h post-transfección.

3.2. Bacterias

LB: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0 y agar 1.5% para medio sólido. Este medio se empleó para amplificar todos los plásmidos por miniprep, en células DH5 α . Cuando se preparó LB-agar (medio sólido), se añadió el antibiótico ampicilina o kanamicina (concentración final 100 μ g/ml).

2XYT: Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0. Este medio se empleó para la expresión de proteínas recombinantes en células BL21.

3.3. Levaduras

YPDA: peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, sulfato de adenina 0.004% y agar 2% para medio sólido. Medio complejo de crecimiento de levaduras, empleado para el crecimiento de las células Y190 sin transformar.

SD: base de nitrógeno de levaduras (YNB) sin aminoácidos al 0.67%, glucosa al 2% y agar al 2% para medio sólido. Medio mínimo con sales, elementos traza, vitaminas, una fuente de nitrógeno y glucosa, empleado para la selección de las levaduras transformadas con los diferentes plásmidos. A este medio se le añaden suplementos como el 3-amino-triazol (3-AT), que inhibe la síntesis constitutiva de histidina, y los L-aminoácidos necesarios en cada caso (leucina, triptófano e histidina).

4. Plásmidos

4.1. Plásmido pCWori (pTACTAC)

Es un regalo de R. Fletterick (Universidad de California, San Francisco). Utilizado para la expresión de las proteínas recombinantes en bacterias *E. coli*. El promotor *tac* duplicado permite la expresión continua y sostenida de proteína tras la inducción con IPTG. El gen que codifica para la proteína de interés que se desea expresar de forma recombinante, se liga en el sitio de multiclonación en la orientación correcta y con el correcto marco de lectura de modo que se añade una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que permite la posterior purificación de la proteína recombinante mediante una columna de afinidad Ni-NTA agarosa. Este vector se replica de forma autónoma en *E. coli* y confiere resistencia a ampicilina.

4.2. Plásmido pDEST15 (Invitrogen-Life Technologies)

Vector empleado para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias *E. coli*, tras la inducción con IPTG. La proteína de interés, en nuestro caso el dominio catalítico activo de PKD1 (PKD1-cat activo), se expresa fusionado a la proteína glutatión sintetasa transferasa (GST), la cual queda en el extremo N-terminal, lo que permite la posterior purificación de la proteína recombinante mediante una columna de afinidad Glutathion-Sepharaosa. Este vector confiere resistencia a ampicilina y cloranfenicol.

4.3. Plásmido pKLSL Δ

Es un regalo de J. M. Mancheño (Instituto Rocasolano, CSIC, Madrid) (Mancheño-Gómez y Angulo-Herrera, 2009). Utilizado para la expresión de las proteínas recombinantes en bacterias *E. coli*, tras la inducción con IPTG. Genera una proteína de fusión que contiene un fragmento de la lectina hemolítica (LSL) del hongo *Laetiporus sulphureus* en el extremo N-terminal, lo que permite su purificación mediante una columna de afinidad Sepharosa 4B. La secuencia comprendida entre el final de la lectina y el sitio de multiclonaje, corresponde a la secuencia de corte por una proteasa viral (TEV). Este vector se replica de forma autónoma en *E. coli* y confiere resistencia a kanamicina.

4.4. Plásmido pEFBOS

Este plásmido que presenta un promotor muy fuerte, se emplea para la sobreexpresión de la proteína de interés en células de mamífero. El vector fue cedido por la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid) y genera una proteína de fusión con la proteína GFP en el extremo N-terminal. Nos cedió dicho plásmido con las distintas construcciones de PKD1 clonadas, que habían empleado previamente en su laboratorio (Matthews et al., 1999a; Matthews et al., 2000; Sanchez-Ruiloba et al., 2006). A partir de este vector y mediante genética molecular, generamos un vector pEFBOS sin GFP, adecuado para la sobreexpresión de la proteína eNOS ya que es preferible que no presente ningún epítipo ni en el extremo N-terminal ni en el C-terminal. Confiere resistencia a ampicilina.

4.5. Plásmido pcDNA3

Este vector, con las construcciones correspondientes a la nNOS de rata silvestre (nNOS) y el mutante puntual nNOS-Ser1412Ala (nNOS^{S1412A}), fue cedido por el Dr. G. A. Rameau y el Dr. E. B. Ziff (Rameau et al., 2007). Genera una proteína fusionada a un epítipo *myc* en su extremo N-terminal y es adecuado para la sobreexpresión de la proteína de interés en células de mamífero. Confiere resistencia a ampicilina. La Dra. Teresa Iglesias, también nos cedió distintas construcciones de la PKD1 clonadas en este plásmido, sin GFP ni epítipo *myc*.

4.6. Plásmido pLKO-1 (MISSION® shRNA)

Vector empleado para silenciar la expresión de una proteína de interés en células de mamífero. La introducción del plásmido ya sea transfectando o mediante infección con lentivirus, pone en marcha el mecanismo de RNA de interferencia. Una vez que el shRNA (*short hairpin* RNA) es transcrito, da lugar a una estructura en forma de horquilla que es reconocida y procesada por Dicer, que genera un siRNA (*small interfering* RNA). El complejo RISC (*RNAi-Induced Silencing Complex*) separa las dos hebras del siRNA y el complejo activado con la hebra antisentido de siRNA unida, se dirige hacia el mRNA diana (reconocimiento mediado por la hebra de siRNA), produciéndose el consiguiente corte del mismo y posterior degradación, reduciéndose de esta forma los niveles de proteína total.

4.7. Plásmido pGAD GH (BD Clontech)

Vector empleado en los ensayos de doble híbrido de levadura, que genera una proteína híbrida que contiene la secuencia del dominio de activación de la transcripción del factor de transcripción GAL4 (DNA-AD; aa 768-881). El gen que codifica para la proteína de interés se liga en el sitio de multiclonaje, el cual se localiza en el extremo 3' del marco de lectura abierto de la secuencia del dominio de activación, en la orientación correcta y con el correcto marco de lectura de modo que se genera una proteína de fusión. La proteína de fusión se expresa a elevados niveles en levaduras a partir del promotor constitutivo ADH1; la transcripción finaliza en la señal de terminación de la transcripción ADH1. La proteína híbrida es dirigida hacia el núcleo de la levadura mediante secuencias de localización nuclear que han sido añadidas a la secuencia del dominio de activación a partir de una fuente heteróloga. Es un vector que se replica de forma autónoma tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*. Contiene el gen *bla* (confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*) y el marcador nutricional LEU2, que permite que las levaduras auxótrofas que contienen este vector puedan crecer en un medio sintético limitante que carece de leucina. Alternativamente se empleó el plásmido pACT2, que presenta unas características similares, y también genera una proteína híbrida que contiene la secuencia del DNA-AD del factor de transcripción GAL4.

4.8. Plásmido pGBT9 (BD Clontech)

Vector empleado en los ensayos de doble híbrido de levadura, que genera una proteína híbrida que contiene la secuencia del dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4 (DNA-BD; aa 1-147). Es similar al pGAD, pero en este caso contiene el marcador nutricional TRP1, que permite que las levaduras auxótrofas que contienen el vector crezcan en un medio sintético limitante que carece de Trp. Alternativamente se empleó el plásmido pGBKT7, que presenta unas características similares, y también genera una proteína híbrida que contiene la secuencia del DNA-BD del factor de transcripción GAL4.

MÉTODOS.

1. Clonación en el vector de expresión en bacterias pCWori, expresión recombinante y purificación de las construcciones de las tres NOSs.

Todas las construcciones fueron clonadas mediante PCR introduciendo los sitios de restricción NdeI (en el extremo 5') y XbaI (en el extremo 3'). Tras la digestión del producto de PCR con ambas enzimas, cada fragmento se ligó en el vector de expresión bacteriano pCWori, que introduce una secuencia de 6 histidinas en fase con el extremo N-terminal de la proteína recombinante tal y como se describió anteriormente (Rodríguez-Crespo et al., 1999; Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). Las construcciones se comprobaron mediante secuenciación automática. Dado la inestabilidad de todas las isoformas de NOS, las purificaciones de las distintas proteínas se llevaron a cabo a 4°C en un solo día. La concentración de las proteínas completas (y que por tanto contienen el grupo hemo), se determinó a partir del espectro de absorción de cada una usando el coeficiente de extinción $\epsilon_{400} = 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la enzima férrica (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996).

1.1. Dominio reductasa de la eNOS.

Esta construcción había sido elaborada anteriormente en el grupo. Usando como molde el cDNA de la eNOS bovina, se clonó el dominio reductasa (aa 489-1205) en el vector pCWori. Con este vector se transformaron las células competentes BL21(DE3) de *E. coli* y se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante, en medio de crecimiento 2XYT, llevando a cabo la inducción con IPTG 1 mM una vez que la DO600 fue de 1, a 22°C. Las bacterias se lisaron y se resuspendieron en Tris 100mM, pH 7.0, en presencia de los inhibidores de proteasas leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 2 μM . La proteína se purificó en dos etapas, con dos columnas de afinidad, la primera de ellas de Ni-NTA, a la que se une por las 6 histidinas, y la segunda de 2',5'-ADP-Agarosa, a la cual se une por su dominio NADPH, siguiendo las instrucciones del fabricante (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996).

1.2. nNOS completa y dominios hemo-oxigenasa y reductasa.

Empleando como molde el cDNA de la nNOS de rata, la proteína completa (aa 1-1429), la mitad N-terminal de la nNOS que comprende el dominio hemo oxigenasa (aa 1-759) o la mitad C-terminal que incluye el dominio reductasa (aa 715-1429), se clonaron en el vector pCWori (Rodríguez-Crespo et al., 1999). Cada una de las dos mitades de la nNOS incluye la secuencia de unión de CaM ya que la unión de CaM ayuda al plegamiento de la proteína y favorece el rendimiento total (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). La expresión y purificación de la nNOS completa en este vector ya ha sido descrita (Gerber et al., 1997). De forma general, la expresión se llevó a cabo en células BL21, tras inducción con IPTG 1 mM, a 22°C durante 20 h, en coexpresión con el plásmido pACYC que contiene el cDNA de la CaM y que confiere resistencia a cloranfenicol como se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Crespo et al., 1999). La proteína nNOS completa y el dominio reductasa se purificaron en dos etapas, con dos columnas de afinidad, la primera de ellas de Ni-NTA y la segunda de 2',5'-ADP-Agarosa, mientras que el dominio hemo-oxigenasa se purificó sólo mediante una columna de Ni-NTA como se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Crespo et al., 1999; Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996).

1.3. iNOS completa y dominio reductasa y sus respectivos mutantes delecionados en el extremo C-terminal $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 15$.

Empleando como molde el cDNA de la iNOS de macrófago de ratón clonado en el vector pCWori (pCWori-mmiNOS wt) regalo del Dr. Paul Ortiz de Montellano (Universidad de California, San Francisco), la proteína completa (aa 1-1144), o la mitad C-terminal que incluye el dominio reductasa (aa 495-1144), así como los mutantes delecionados en el extremo C-terminal $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 15$ de ambas construcciones, se clonaron en el vector pCWori. Al igual que en la clonación de la nNOS, el dominio reductasa incluye la secuencia de unión de CaM. La expresión se llevó a cabo en células BL21, tras inducción con IPTG 1 mM, a 22°C durante 20 h, coexpresando la CaM, necesaria para lograr el correcto plegamiento de la iNOS (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). Todas las proteínas se purificaron en dos etapas, con dos columnas de afinidad, la primera de ellas de Ni-NTA y la segunda de 2',5'-ADP-Agarosa (Rodríguez-Crespo et al., 1999; Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996).

2. Clonación, expresión recombinante y purificación del dominio catalítico de PKD1 fusionado a GST.

El plásmido correspondiente a la construcción GST-PKD1cat, nos fue cedido por la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid). Para llevar a cabo su clonación, la región C-terminal de PKD1 (Ser558-Leu918; PKD1cat) que contenía el dominio catalítico completo se amplificó mediante PCR empleando como molde el plásmido pBS-PKD1 y el producto de PCR se clonó en el vector pDONR201 mediante una reacción de recombinación con clonasa BP (GATEWAY system, Invitrogen-Life Technologies), para generar la

construcción pENTR-PKD1cat. Tras secuenciación automática, el fragmento PKD1cat se subclonó en el vector pDEST15 empleando la clonasa LR. Este vector de expresión en procariotas da lugar al dominio catalítico activo de PKD1 (PKD1-cat activo) fusionado a la proteína GST (GST-PKD1cat) con una masa molecular aproximada de 65 kDa. La expresión se llevó a cabo en células BL21(DE3), en 3 l de medio LB con antibióticos, tras inducción con IPTG 1 mM, a 30°C durante 4 h. Las bacterias se resuspendieron y lisaron en PBS en presencia de lisozima y ditiotreitól 10 µM, y de los inhibidores de proteasas leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml y PMSF 2 µM seguido de sonicación. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad con resina de Glutathion-Sephara, según las especificaciones del fabricante. Se dializó en tampón Tris 50 mM, pH 7.0, 100 mM NaCl, para eliminar el glutathion presente en el tampón de elución. Esta proteína es constitutivamente activa ya que carece del dominio regulador autoinhibitorio.

3. Clonación en el vector de expresión en bacterias pCWori, expresión recombinante y purificación del dominio PDZ1 de EBP50.

Empleando como molde el plásmido pACT2-EBP50, se clonó el dominio PDZ1 (aa 1-99) de EBP50 en el vector pCWori, entre los sitios de restricción NdeI y XbaI. La expresión se llevó a cabo en células BL21, tras inducción con IPTG 1 mM, a 30 °C durante 20 h. El pellet celular se lisó en Tris 0.1 M, pH 7.0 en presencia de inhibidores de proteasas y lisozima, seguido de sonicación y la proteína se purificó mediante una cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA.

4. Clonación en el vector de expresión en bacterias pKLSLT, expresión recombinante y purificación de CAP70 completa.

Se diseñaron oligonucleótidos para clonar CAP70 completa (o NHERF-3) en el vector pKLSLT, entre los sitios de restricción EcoRI y XhoI (pKLSLT-CAP70). La expresión se llevó a cabo en células BL21, tras inducción con IPTG 1 mM, a 30 °C durante 20 h. El pellet celular se lisó en Tris 0.1 M, pH 7.0 en presencia de inhibidores de proteasas y lisozima, seguido de sonicación y la proteína se purificó mediante una cromatografía de afinidad en una columna Sepharosa 4B. La elución se realizó con lactosa 200 mM en Tris 0.1 M, pH 7.0.

5. Clonación de las construcciones de PKD1 en el vector de expresión en células de mamífero pEFBOS.

La Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid), nos cedió todas las construcciones correspondientes a la PKD1 clonadas entre los sitios EcoRI en el vector pEFBOS, que contienen la GFP en el extremo N-terminal, para su transfección en células de mamíferos y consiguiente sobreexpresión de la proteína de interés. Los plásmidos que nos cedió corresponden a las siguientes construcciones: el vector vacío pEFBOS-GFP, o la GFP fusionada a PKD1 silvestre (PKD1), mutante quinasa inactivo (mutante sencillo Asp733Ala; PKD1ki), mutante constitutivamente activo (doble mutante Ser744/748Glu; PKD1ca), mutantes de delección que carecen del dominio PH (PKD1^{ΔPH}) o del dominio CRD (PKD1^{ΔCRD}), o un mutante al que se ha delecionado el motivo de unión a PDZ (PKD1^{ΔSIL}) que han sido utilizados previamente (Matthews et al., 1999a; Matthews et al., 2000; Sanchez-Ruiloba et al., 2006). Algunas de estas construcciones nos las cedió clonadas en el vector pcDNA3, también para sobreexpresión en células de mamíferos, que no tiene la GFP.

6. Clonación de las construcciones de eNOS bovina en el vector de expresión en células de mamífero pEFBOS, previa eliminación de la GFP.

A partir del plásmido pEFBOS-GFP que nos cedió la Dra. Teresa Iglesias, mediante genética molecular se eliminó la GFP y en este mismo plásmido se clonaron las distintas construcciones de la eNOS bovina entre los sitios de restricción NheI y EcoRI. Para ello se diseñaron distintos oligonucleótidos y se empleó de molde para la PCR el plásmido pCW-eNOS bovina completa. Se clonaron eNOS completa (eNOS, aa 1-1205), y el dominio NADPH (NADPH, aa 988-1205) y sus respectivos mutantes no fosforilables (Ser1179Ala); un mutante delecionado en el C-terminal Δ27 (eNOSΔ27, aa 1-1178), y el dominio hemo oxigenasa (HEMO, aa 1-521). Estas construcciones se emplearon para la transfección en células de mamíferos y consiguiente sobreexpresión de la proteína de interés.

7. Clonación de las construcciones para los ensayos de doble híbrido de levadura de las construcciones de PKD1, nNOS y CAPON.

El grupo de la Dra. Teresa Iglesias, elaboró distintas construcciones de la PKD1 para los ensayos del doble híbrido de levadura. Así, mediante PCR y empleando dos oligonucleótidos que introducían los sitios de restricción NdeI/EcoRI para su posterior ligación en el vector pGBKT7 en fase con el dominio de unión a DNA de GAL4, clonaron el dominio catalítico activo completo de PKD1 (aa 557-918) o dos construcciones C-terminales más cortas (aa 591-918) las cuales contenían el motivo de unión a PDZ de PKD1 silvestre o el mutante fosfomimético PKD1-

Ser916Glu (PKD1S916E, descrito en (Sanchez-Ruiloba et al., 2006)). Para llevar a cabo los ensayos de doble híbrido de levadura, por otro lado nosotros llevamos a cabo la clonación de dos construcciones correspondientes al dominio PDZ de la nNOS, que se amplificaron mediante PCR empleando oligonucleótidos que introducían los sitios EcoRI y Sall para su clonación en el vector pGAD, en fase con el dominio de activación de GAL4. Una construcción más corta que contenía solo el dominio PDZ de la nNOS (aa 1-102) y otra más larga (aa 1-131) que incluye la extensión C-terminal que se encuentra a continuación del dominio PDZ (horquilla β) y que representa una unidad estructural relativamente independiente que media la interacción entre nNOS y otras proteínas con dominios PDZ como PSD-95 y α 1-sintrofina (17). Como control, ambas construcciones correspondientes a la nNOS se lanzaron frente a α 1-sintrofina, construcción elaborada con anterioridad por el grupo de T. Iglesias: la construcción más larga como control positivo y la más corta que carece de la horquilla β como control negativo. Además llevamos a cabo la clonación de los últimos aminoácidos de CAPON en el vector pGBT9 entre los sitios de restricción EcoRI y Sall, para lo cual diseñamos dos oligos solapantes correspondientes a esa secuencia. Esta construcción se empleó como control positivo de la interacción con el dominio PDZ de la nNOS, pues se ha descrito que su extremo C-terminal contiene un motivo de unión a PDZ que interacciona con el PDZ de la nNOS (Jaffrey et al., 1998).

8. Ensayo quinasa *in vitro*.

La fosforilación de la eNOS por el dominio catalítico de PKD1 (GST-PKD1cat) se llevó a cabo mediante un ensayo quinasa *in vitro*. El dominio reductasa de la eNOS purificado en ausencia de CaM, y la quinasa GST-PKD1cat se mezclaron en tampón de ensayo (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, y ditiotreitól 1 mM), y se sometieron a ensayo quinasa *in vitro* durante 1 h a RT en presencia o ausencia de ATP a concentración final 100 μ M. Las muestras se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-eNOS, anti-eNOS-pSer¹¹⁷⁷, anti-PKD y anti-PKD-pSer⁹¹⁰.

La fosforilación de las proteínas purificadas nNOS completa, o de los dominios reductasa y hemo oxigenasa por el dominio catalítico de PKD1 (GST-PKD1cat) se llevó a cabo de manera similar mediante ensayo quinasa *in vitro*, en tampón Tris-HCl 30 mM, pH 7.6, MgCl₂ 10 mM, y ditiotreitól 2 mM, durante 30 min a 30°C empleando en este caso [³²P] ATP o ATP no radiactivo a concentración final 100 μ M. Las muestras se analizaron mediante PAGE-SDS y tinción con rojo Ponceau, autorradiografía o inmunodetección, tal y como se indica en los distintos experimentos.

9. Identificación del residuo fosforilado en eNOS y en nNOS por PKD1 mediante espectrometría de masas o MALDI-TOF/TOF.

Los productos de la reacción quinasa *in vitro* tras la fosforilación tanto de eNOS como de nNOS mediante la proteína recombinante correspondiente al dominio catalítico activo de PKD1 fusionada a GST (GST-PKD1cat. active), fueron digeridos con tripsina y analizados mediante HPLC seguido de MALDI-TOF/TOF y fragmentación de los péptidos y secuenciación *de novo* en la Unidad de Estudios Proteómicos (Unidad de Proteómica; Facultad de Farmacia Parque Científico de Madrid, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain). Los análisis MALDI-TOF MS se realizaron en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada). Los péptidos seleccionados, se sometieron a análisis MS/MS empleando el equipo 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA).

10. Cultivos celulares y transfección.

Las células se sembraron al 60-80% de confluencia para su transfección con el reactivo Lipofectamine2000® (Invitrogen-Life Technologies), siguiendo las especificaciones del productor, y se recogieron para su procesamiento 36-48 h más tarde. En los experimentos en que se valoró peNOS, un día antes de la recogida de las células HEK293T o BAEC, se dejaron las células en su medio pero en ausencia de FBS, con el objetivo de disminuir la fosforilación endógena por otras quinasas. Cuando fue necesario las células se trataron con PDBu (1 μ M) durante 15 min, 8-Br-cGMP (100 μ M) durante 30 min, el ionóforo de calcio A23187 (10 μ M) o L-NAME (100 μ M) durante 24 h, según se especifica en los distintos experimentos. Asimismo, cuando fue necesario se añadió extra L-Arg (5 mM) y BH₄ (15 μ M). Las cinéticas con PDBu (1 μ M) o VEGF (10 ng/ml) se realizaron hasta un tiempo de 30 min.

11. Inmunofluorescencia de células fijadas.

Para llevar a cabo las inmunofluorescencias, se sembraron células BAEC sobre cristales sin tratar y se transfectaron con las construcciones deseadas. Dos días después de la transfección y tras el tratamiento indicado en cada experimento, se lavaron las células con PBS y seguidamente se incubaron con metanol a -20°C, durante 10 min, a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS y a continuación se trataron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células, y tras 3 lavados con PBS, se

llevaron a cabo inmunofluorescencias con diversos anticuerpos primarios, incubando las células con una dilución 1:250 o 1:300 de los mismos en PBS + BSA al 1%, durante 2 h a RT. Tras 3 lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente marcado con Cy3 1:300 en PBS+ BSA al 1%, durante 1 h a RT. Antes del montaje, se realizaron 3 lavados con PBS. La tinción de los núcleos se llevó a cabo con DAPI que venía disuelto en la solución de montaje. La localización subcelular se analizó en un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss) empleando una longitud de onda de excitación de 405 nm para el Hoescht, 488 nm para la fluorescencia de la GFP y 543 nm para el fluoróforo Cy3 (rojo). Este microscopio está compuesto por un microscopio invertido de luz transmitida y epifluorescencia Observer.Z1 acoplado a un sistema confocal espectral con 6 líneas de láser y varios objetivos disponibles (Plan-APOCHROMAT). El programa de adquisición y análisis de imagen que maneja es el Zen2009. Todas las imágenes han sido adquiridas en modo secuencial para evitar posibles cruces de canales. En todos los casos se muestra una sección óptica menos en aquellos casos en los que se detalla que se ha usado la proyección máxima.

12. Extractos proteicos e inmunoprecipitación.

Las células tratadas o transfectadas, se lisaron en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (tampón RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7.35, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.1%, SDS al 0.1%) con inhibidores de proteasas y de fosfatasa durante 45 min a 4°C, y los lisados se centrifugaron durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C, para eliminar los restos celulares no lisados. Cuando fue necesario, la eNOS endógena o las distintas construcciones de esta isoforma sobreexpresadas, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo policlonal casero anti-eNOS, y del mismo modo myc-nNOS o myc-nNOS^{S1412A} se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-myc. Cuando se inmunoprecipitaron las distintas construcciones de GFP-PKD, se empleó el anticuerpo anti-GFP. Para ello 70 µl del sobrenadante se incubaron con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C, con agitación y posteriormente con 30 µl de una suspensión 1:1 de sepharosa:proteína A-Sepharosa, durante 4 horas en las mismas condiciones. Cantidades equivalentes de lisado total o volúmenes equivalentes de inmunocomplejos se analizaron mediante SDS-PAGE, para lo cual las muestras con tampón de aplicación, no se hirieron sino que se calentaron 15 min a 65°C.

13. Transferencia e inmunodetección (Western Blot)

En los experimentos de inmunodetección, las proteínas fueron separadas en geles de poliácridamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, de Amersham). Tras un bloqueo de una hora con leche en polvo desnatada al 4% (p/v) en PBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario o al menos 2 h a RT o bien durante toda la noche a 4°C. A continuación se sometieron a tres lavados de 10 min con PBS, luego se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dirigido contra la fracción constante de IgG de conejo o de ratón) durante una hora a temperatura ambiente, se volvieron a lavar tres veces y finalmente, se revelaron usando un kit de quimioluminiscencia (ECL, Pierce). La cuantificación de la intensidad de las bandas (densitometrado) se realizó utilizando el software Multi Gauge V3.0. (Fujifilm).

14. Ensayo de reparación de la herida (wound healing).

La capacidad de migración de las células endoteliales BAEC inducida por VEGF o PDBu tras el tratamiento con distintos inhibidores de quinasas o de eNOS, se valoró mediante un ensayo de reparación de herida (*wound healing*). Se sembraron células BAEC en placas de 24 pocillos a 35000 células/pocillo. Al día siguiente, las monocapas confluentes se incubaron con medio en ausencia de FBS. Dos días después de su siembra, se cambió de nuevo el medio a medio sin FBS con extra L-Arg (5 mM) y BH₄ (15 µM), y se preincubaron con los distintos inhibidores de las quinasas (Gö6976 20 µM; uninhibidor específico de PKD 2.5 µM; Tricibirine 1-2 µM, inhibidor Akt1/2 quinasa 20-40 µM) o de eNOS (L-NAME 500 µM) durante 1 h en la estufa, antes de añadir o no el VEGF (10 ng/ml) o el PDBu (1 µM), en presencia de los inhibidores. Inmediatamente realizado este último tratamiento, se procedió a realizar la "herida" que consistió en una brecha trazada a lo largo del pocillo con una punta común de 200 µl. Las placas se instalaron en un microscopio con regulación de la temperatura a 37°C, y se realizó una foto del área seleccionada de cada pocillo, cada 30 min durante 24 h. El área de la herida libre de células se monitorizó a los tiempos indicados utilizando una cámara conectada a un microscopio invertido. La imagen posteriormente fue capturada en una tarjeta y analizada con un programa de análisis de imagen (NIH Image 1.55). El efecto de reparación de la herida se calculó como porcentaje de recuperación del área con respecto al área inicial de la herida, empleando la siguiente fórmula (Reinhart-King, 2008).

$$\text{Área recuperada (\%)} = [(\text{Área de la herida } t=0 \text{ h} - \text{Área de la herida } t=24 \text{ h}) / \text{Área de la herida } t=0 \text{ h}] * 100$$

15. Medida de los niveles intracelulares de •NO mediante DAF2-DA

Los niveles intracelulares de $\bullet\text{NO}$ se valoraron con la sonda fluorescente 4,5 diaminofluoresceína diacetato, DAF2-DA. Este compuesto no es fluorescente hasta que reacciona con el $\bullet\text{NO}$. La membrana celular es permeable a DAF2-DA de modo que el reactivo puede entrar de forma pasiva. Una vez en el interior celular, es hidrolizado por esterasas intracelulares para convertirse en DAF2 (4,5 diaminofluoresceína), que reacciona con el $\bullet\text{NO}$ para formar un benzotriazol fluorescente (DAF-2T, triazolofluoresceína) (Kojima et al., 1998a; Kojima et al., 1998b). Este producto fluorescente puede cuantificarse valorando la emisión de fluorescencia a 515 nm, previa excitación a 495 nm. Para ello se transfectaron las células con plásmidos de sobreexpresión en células de mamífero que no tuvieran la GFP ya que emite, a una longitud de onda similar a la sonda, por lo que se emplearon las construcciones de sobreexpresión de PKD1 clonadas en el vector pcDNA3, cedidas por la Dra. T. Iglesias.

En los experimentos de la eNOS, se transfectaron células COS-7 con el plásmido pcDNA3 vacío como control negativo, o con el plásmido previamente clonado en nuestro grupo pcDNA5-iNOS completa como control positivo y de máxima señal, o bien se cotransfectaron las células con el plásmido pEFBOS-eNOS completa silvestre o el mutante no fosforilable Ser1179Ala junto con los plásmidos pcDNA3 vacío o pcDNA3-PKD1wt. Al día siguiente se cambió el medio a las células a su medio sin FBS con extra L-Arg (5 mM) y BH_4 (15 μM). Dos días después de la transfección, se cambió el medio a su medio sin FBS con la sonda fluorescente DAF2-DA a concentración 25 μM , y se incubaron las células al menos 3 h en la estufa, tras lo cual se lavaron y a continuación se trataron o no con PDBu 1 μM , o con VEGF 10 ng/ml, durante 1 h en la estufa. Las células se lavaron y se procedió a tomar fotos en el microscopio de fluorescencia.

En los experimentos de la nNOS, se transfectaron células COS-7 con el plásmido pcDNA3 vacío como control negativo, o con el plásmido previamente clonado en nuestro grupo pcDNA5-iNOS completa como control positivo y de máxima señal, o bien se cotransfectaron las células con el plásmido pcDNA3-nNOS cedido por el Dr. G. A. Rameau y el Dr. E. B. Ziff y con el pcDNA3 vacío o con el pcDNA3-PKD1wt. Al día siguiente se cambió el medio a las células a su medio normal con extra L-Arg (5 mM) y BH_4 (15 μM). Dos días después de la transfección, se cambió el medio a medio normal con la sonda fluorescente DAF2-DA a concentración 25 μM , y se incubaron las células al menos 3 h en la estufa, tras lo cual se lavaron y se procedió a tomar fotos en el microscopio de fluorescencia.

16. Ensayo de reducción de citocromo c.

La actividad reductasa de las proteínas purificadas de iNOS completa y de los dominios reductasa, así como de sus mutantes de delección, fue determinada empleando el citocromo c como aceptor de electrones (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). El ensayo se llevó a cabo a 37°C, en un volumen final de 500 μl . Se prepararon 9.5 ml de tampón de ensayo que contiene 1 ml de Hepes 500 mM, pH 7.5, 1 ml de BSA 1mg/ml en agua, 1 ml de CaCl_2 1 M y 100 μl de catalasa (10 U/ μl) y el resto de agua destilada, se atemperó en un baño a 37°C. Se pipetearon 474 μl de esta solución en una cubeta y se dejó estabilizar a 37°C dentro del espectrofotómetro. Se añadió el volumen de iNOS correspondiente en la cubeta y se mezcló por inversión. Se dejó estabilizar en el interior del espectrofotómetro. Para iniciar la reacción se añadieron 20 μl de NADPH 10 mM (en Tris 25 mM) y 6 μl de una solución de citocromo c 5 mM en gotas separadas en un trocito de parafilm. Se mezcló todo por inversión. Se midió la absorbancia a 37°C a 550 nm durante 2 min y se calculó la pendiente en cada caso ($\epsilon_{550\text{ nm}} = 21\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Tras varios tanteos, se determinó que la cantidad de iNOS óptima para poder determinar cambios en la pendiente tras la incubación con las proteínas PDZ era de 0.6 μg . Para ver el efecto de la interacción con ambas proteínas PDZ purificadas, se comprobó que era preciso llevar a cabo la preincubación de la iNOS con cada una de ellas antes de realizar el ensayo. En cada caso se preincubaron al menos 4 h a 4°C los 0.6 μg de iNOS con distintas cantidades de cada una de las proteínas PDZ recombinantes, y cada punto se analizó por duplicado. Cada pendiente se relativizó a la pendiente registrada ese día en el ensayo empleando el dominio reductasa de iNOS silvestre sin incubar con proteína PDZ.

17. Ensayo de reoxidación de flavinas.

El fundamento de este ensayo radica en que el NADPH cede electrones al FAD y éste al FMN. Así el FAD de la iNOS que inicialmente estaba oxidado (FAD) se reduce durante el tiempo que haya electrones (FADH_2). Una vez agotados los electrones del NADPH, el FAD puede ocurrir que vuelva a su estado oxidado, o bien que quede como semiquinona estable, con un electrón (FADH^+). Se prepararon disoluciones del dominio reductasa de la iNOS (silvestre, $\Delta 10$ y $\Delta 15$), a una concentración de proteína de 5 μM , diluyendo cada *stock* de proteína en Tris 50 mM, pH 7.0 NaCl 100 mM. Se tomaron 400 μl de la disolución de proteína y se comenzó a medir a 459 nm (la λ_{max} en el espectro de las reductasas) a temperatura ambiente durante 6 min. Transcurridos unos 15 seg, se añadió el NADPH, a una concentración final 20 μM , procurando homogeneizar la muestra y evitando burbujear. Además, y al mismo tiempo que se realizó cada ensayo se observó el cambio espectral antes de añadir el NADPH, nada más añadirlo (FADH_2) y el estado final de semiquinona (FADH^+). Se realizó un espectro antes de añadir el NADPH,

donde la longitud de onda a 459 nm refleja el estado del FAD. Del mismo modo se realizó un espectro al final del ensayo. Para poder registrar el espectro en el estado reducido (FADH_2), fue preciso añadir una concentración mayor de NADPH (75 μM), para que tarde más en consumirse y de tiempo a registrar el espectro.

Para analizar el efecto de EBP50 sobre el dominio reductasa de la iNOS silvestre, se incubaron ambas proteínas al menos 1 h a RT. En este caso cada muestra a analizar consistió en tomar 50 μl del dominio reductasa de la iNOS silvestre (queda 2.3 μM), 50 μl de EBP50 (queda 4.2 μM) o de su tampón de diálisis para el control, y 300 μl de tampón de iNOS (Tris 50 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM). Se añadió el NADPH a una concentración final 10 μM .

18. Determinación de la liberación de $\bullet\text{NO}$.

La determinación de la actividad de la iNOS, se realizó mediante la cuantificación de la concentración de nitritos en el medio mediante el método de Griess. Debido a que el $\bullet\text{NO}$ es altamente reactivo, en contacto con el oxígeno se oxida a nitratos y nitritos, por lo que, una forma indirecta de medir la actividad óxido nítrico sintasa, es la determinación de la concentración de nitritos en el medio, mediante este método colorimétrico. Un volumen de 200 μl de muestra se incubó con 20 μl de ácido sulfanílico (5% H_3PO_4) 100 mM, y tras agitar en vórtex, se adicionaron 20 μl de una solución de NEDA 10 mM. La muestra se dejó reaccionar al menos 15 min a RT, valorándose la absorbancia a 545 o 550 nm. Cada muestra se analizó por duplicado. Se valoraron los nitritos en dos estudios distintos:

- Para valorar el efecto de la delección progresiva del extremo C-terminal, así como el efecto de la incubación con las proteínas PDZ, se valoró la actividad de la iNOS en sus formas completas, midiendo la formación de $\bullet\text{NO}$. Tras tantear distintas concentraciones de iNOS, se determinó que la concentración óptima para realizar el ensayo era de 27.5 nM o de 55 nM (concentraciones a las que el ensayo no estaba saturado, y se veía el mayor cambio en la actividad al incubarse con las proteínas PDZ) en un volumen final de 200 μl . Se preparó un tampón de reacción con L-Arg 20 mM, BH_4 25 μM en DTT 250 μM que mejoran la catálisis y disminuyen el desacoplamiento, iNOS silvestre completa o en su caso los mutantes de delección y tampón similar al que estaba disuelta la iNOS. Este tampón de reacción se alicuotó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y por duplicado se añadieron volúmenes crecientes de una u otra proteína PDZ. En cada muestra se añadió el mismo tampón en que estaba dializada la proteína PDZ, hasta alcanzar así el volumen máximo de proteína PDZ ensayado, minimizando así el efecto del tampón en que estaba disuelta la proteína PDZ. Este proceso se realizó trabajando con la placa sobre hielo. La placa se atemperó 15 min en la estufa a 37°C, para dar tiempo a que la iNOS interaccionara con la proteína PDZ. A continuación se inició la reacción añadiendo el NADPH a una concentración 0.1 mM. Mientras se añadía a cada pocillo, la placa se mantuvo sobre hielo. El tiempo de reacción fue de 15 min, durante los cuales se introdujo la placa a 37°C en la estufa. La reacción se detuvo poniendo la placa en hielo y añadiendo el ácido sulfanílico y NEDA para valorar el $\bullet\text{NO}$ formado midiendo los nitritos en el medio.

19. Estudio de interacciones proteína-proteína mediante el sistema del doble híbrido de levadura.

Para estudiar interacciones proteína-proteína mediante ensayos de doble híbrido de levadura se clonaron las distintas construcciones descritas en el apartado 7 de Métodos en los vectores pGAD o pGBT9 (o el homólogo pGBKT7) (Figura 12).

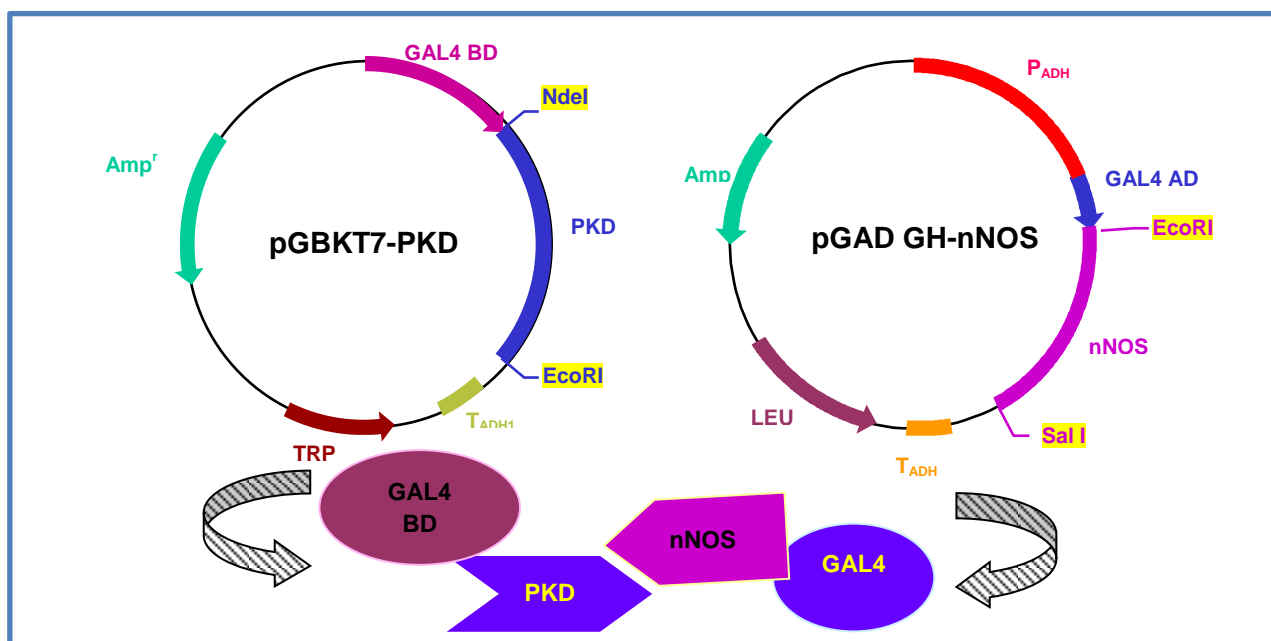


Figura 12. Esquema representativo de los vectores empleados en el sistema. Las proteínas clonadas en pGBT9, se expresan fusionadas al dominio de unión a DNA de GAL4 y las clonadas en pGAD GH, fusionadas al dominio de activación transcripcional de dicho factor de transcripción.

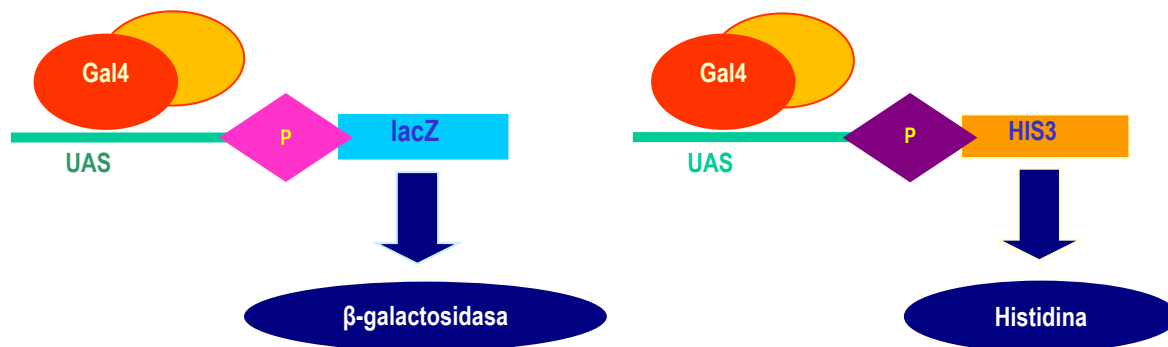


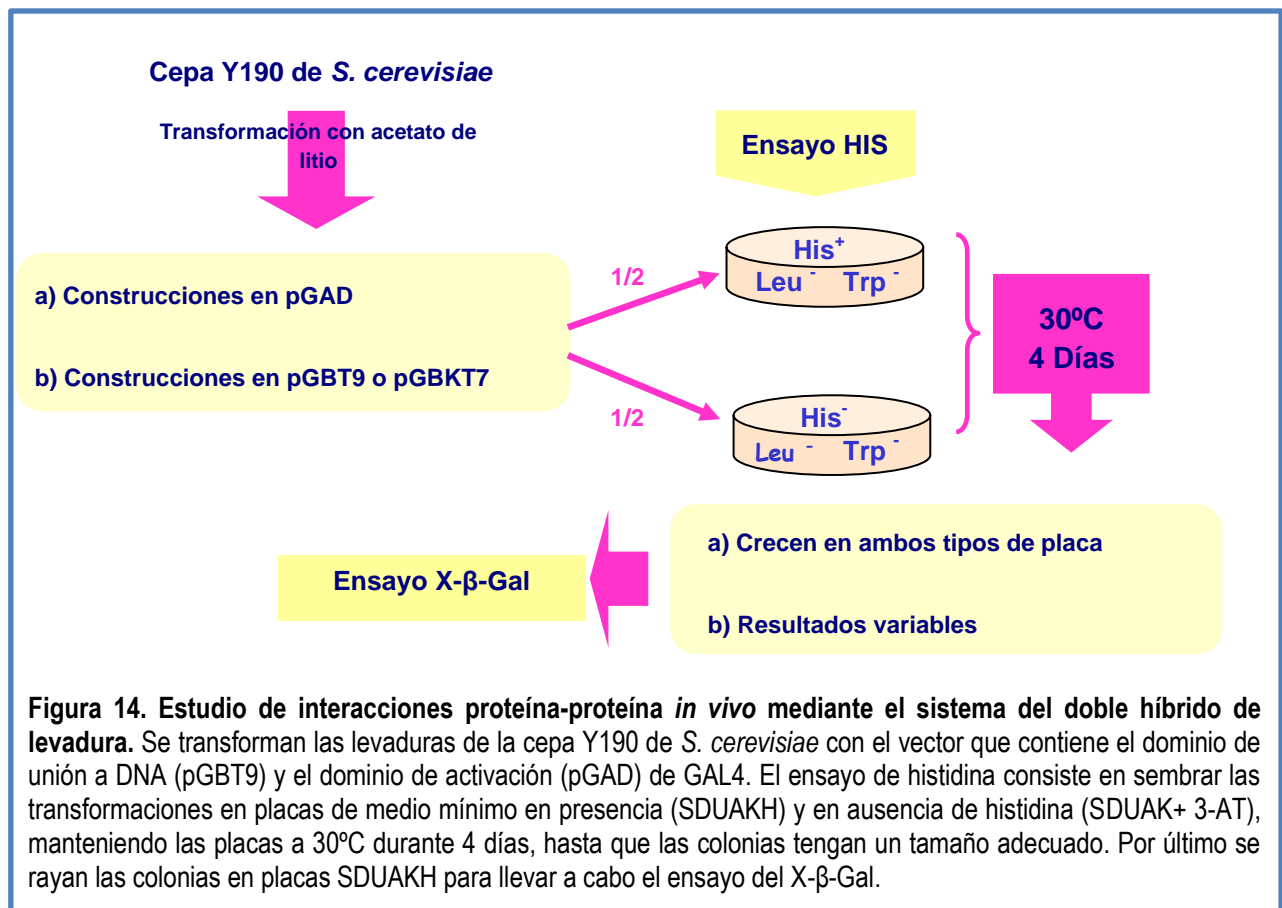
Figura 13. Sistema del doble híbrido de levadura basado en GAL 4. El factor de transcripción GAL4 activa la transcripción del gen HIS3, que confiere a la levadura la capacidad de síntesis de histidina y del gen lacZ, que da lugar a la expresión de la enzima β-galactosidasa.

19.1. Transformación de levaduras por acetato de litio.

Se empleó una cepa de *S. cerevisiae* Y190, que posee unas características genotípicas adecuadas para su uso en este sistema ya que deben ser incapaces de sintetizar Leu, Trp e His y por otra parte deben tener una delección en el gen de GAL4, de forma que no expresen este factor de transcripción. Las características de esta cepa se indican en la tabla 1. Para llevar a cabo la transformación, se inoculó una colonia de la cepa Y190 en 10 ml de YPDA y se mantuvo a 30°C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO600 mayor de 1.5 (aprox. 15h). Se diluyó en 50 ml de YPDA de modo que quedó a una densidad óptica menor de 0.3 y se mantuvo a la misma temperatura y velocidad de agitación hasta que la D.O. fue 0.5-0.7. Posteriormente, se centrifugaron las levaduras a temperatura ambiente durante 5 min a 3500 rpm y el pellet se resuspendió en 50 ml de agua milliQ estéril y se volvió a centrifugar. Se resuspendieron las células en 400 µl de AcLi 0.1 M y se añadió 0.5 µg de cada plásmido junto con 40 µl de DNA de esperma de salmón (yeastmaker DNA carrier, Sigma). Se mezcló bien y se añadió una disolución de PEG (600 µl de una disolución de 2 ml de PEG al 50% + 0.3 ml de AcLi 1 M + 0.7 ml de H₂O milliQ estéril. Mezclar con vórtex) para después mantenerlas a 30°C. Transcurridos 30 min se añadieron 70 µl de DMSO y se incubaron 15 min a 42°C, seguido de 2 min en hielo. Por último se centrifugaron 5 min a 3000 rpm a 4°C, se resuspendieron en 200 µl de H₂O milliQ estéril y se plaquearon en dos tipos de placas: medio mínimo (SD: medio mínimo con una fuente de nitrógeno pero sin aporte de aminoácidos) con histidina y sin histidina (este 2º tipo de placas tiene 3-AT) (Figura 14). Las células se mantuvieron a 30 °C entre 3 y 5 días hasta la aparición de colonias de un tamaño adecuado. Las células Y190 presentan el inconveniente de que a pesar de su genotipo, son capaces de sintetizar His de forma constitutiva, aunque a niveles muy bajos. Por este motivo, para eliminar falsos positivos, se añadió a las placas un inhibidor de la síntesis de histidina, el 3-aminotriazol (3-AT). Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de β-galactosidasa con las colonias de dobles transformantes que crecieron en ausencia de His, con el fin de confirmar la existencia de interacción entre las dos proteínas que se expresaban en la levadura.

Tabla 1. Características fenotípicas de la cepa Y190 de *S.cerevisiae*

Alelo	Fenotipo de la cepa mutante
trp1-901	Trp ⁻ (Requiere triptófano en el medio)
leu2-3,112	Leu ⁻ (Requiere leucina en el medio)
his3-200	His ⁻ (Requiere histidina en el medio)
ade2-101	Ade ⁻ (Genera un pigmento color rojo-rosa)
lys2-801	Lys ⁻ (Requiere lisina en el medio)
gal4-542	GAL4 ⁻ (No expresa el regulador transcripcional GAL4)



19.2. Ensayo de β-galactosidasa.

Se siguió el protocolo descrito por Breeden y Nasmyth (Breeden y Nasmyth, 1985) para determinar la existencia de interacción entre dos proteínas expresadas en colonias doblemente transformadas que fueron capaces de crecer en placas sin histidina. Si se reconstituye la función de GAL4 se inicia la transcripción del gen lacZ de la levadura, apareciendo colonias de color azul. En nuestro caso se llevó a cabo un ensayo cualitativo, para determinar la existencia de interacción. Se rayaron colonias de dobles transformantes crecidas en ausencia de histidina, en placas de medio mínimo con histidina (SDUAKH) y tras 3 días a 30°C se llevó a cabo un replicado empleando filtros estériles del tamaño de las placas y se dejaron crecer en dichos filtros en placas SDUAKH durante 3 días a 30°C. Se llevó a cabo el ensayo de β-galactosidasa, incubando las células, previamente lisadas por congelación en nitrógeno líquido, con una disolución que contenía X-β-Gal, sustrato de la enzima β-galactosidasa. Si se dio la interacción entre dos proteínas se observó la aparición de color azul en las colonias al cabo de unas horas de incubación a 30°C.

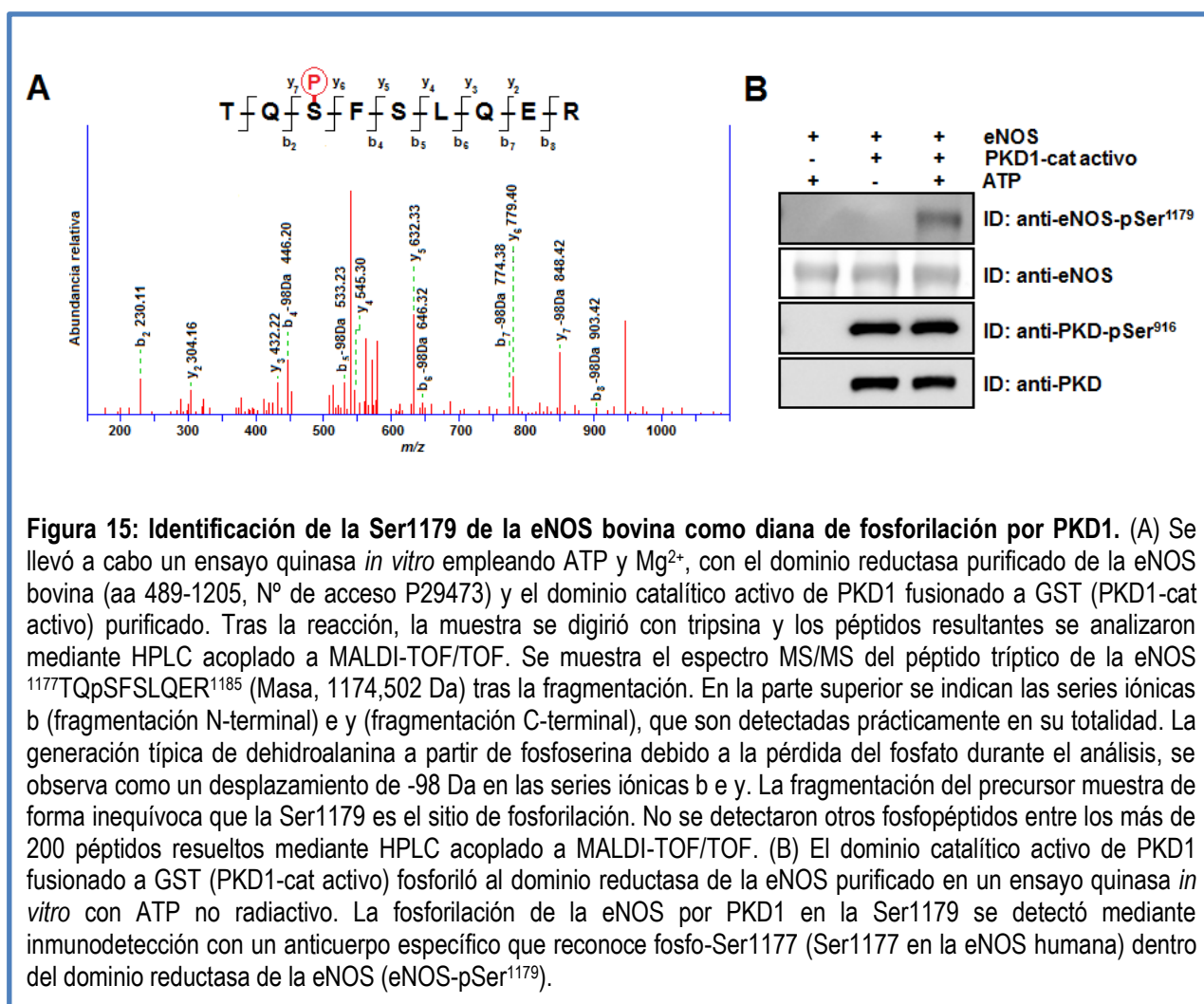


RESULTADOS

BLOQUE 1: La fosforilación de la Ser1179 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS) y la producción de •NO.

1. La eNOS es un nuevo sustrato de la PKD.

La lectura de diversos trabajos, principalmente el de Hao y col. (Hao et al., 2009) en el que empleaban un anticuerpo que reconoce sustratos de PKD en un lisado de células endoteliales HUVEC, y detectaban una banda de 130 kDa que nos hizo sospechar que se tratara de la eNOS, no sólo por el tamaño, sino porque su fosforilación se inducía por VEGF, junto con el hecho de que en este trabajo también se ponía de manifiesto que PKD2 desempeña un papel esencial en la proliferación de células endoteliales y la migración necesaria para la angiogénesis, decidimos estudiar si eNOS era sustrato de PKD.



Para determinar si la eNOS podía ser sustrato de PKD se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* incubando eNOS bovina recombinante purificada con el dominio catalítico activo de PKD1 fusionado a GST (PKD1-cat activo) en presencia de ATP y se procedió a identificar los residuos de la eNOS

fosforilados por PKD1 (Figura 15). El producto de un ensayo quinasa *in vitro* con ATP no radiactivo, fue digerido con tripsina y sometido a HPLC y fragmentación de los péptidos mediante MALDI-TOF/TOF. De los más de 200 péptidos tripticos de la eNOS obtenidos el único fosfopéptido significativo que fue identificado correspondía a TQpSFSLQER (aa T1177-R1185 de la eNOS bovina). La secuenciación *de novo* de un péptido triptico eluido con una masa de 1174,502 Da, mostró que correspondía a la secuencia TQ(pS)FSLQER y el residuo fosforilado se asignó, sin ninguna duda, al aminoácido Ser situado en la tercera posición (pS; b₅ en Figura 15A). Este análisis nos permitió asignar con seguridad que PKD1 fosforila a la eNOS bovina de manera específica en la Ser1179 (TQ-pS¹¹⁷⁹-FSLQER) *in vitro*.

Para confirmar que la Ser1179 de la eNOS era fosforilada por PKD1, se empleó un anticuerpo comercial específico que reconoce esta fosfo-posición en la eNOS (eNOS-pSer¹¹⁷⁹). Se realizó un ensayo quinasa *in vitro* como se ha descrito anteriormente, seguido de inmunodetección (Figura 15B). El anticuerpo anti-eNOS-pSer¹¹⁷⁹ sólo detectaba la eNOS fosforilada cuando había sido preincubada con el dominio catalítico activo de GST-PKD1 en presencia de ATP. La autofosforilación en la Ser916 del dominio catalítico de PKD1 activo también se podía detectar, e incluso en ausencia de ATP ya está fosforilada, indicando que la proteína purificada recombinante está autofosforilada.

Dado que este residuo de Ser fosforilado de la eNOS no había sido predicho que formara parte de una secuencia de fosforilación consenso de PKD1, comparamos la secuencia de aminoácidos de varios sustratos conocidos de PKD1 (Tabla 2). La lista de los sustratos proteicos de la PKD1 es bastante limitada. Sin embargo, típicamente aparece un residuo hidrofóbico como Leu o Ile en posición (-5), junto con un residuo básico como Lys o Arg en posición (-3). Tanto en el caso de la eNOS como en el de la nNOS se cumple sólo uno de estos dos requerimientos. Es interesante que tanto el extremo C-terminal de PKD1 como el de PKD2 y el extremo C-terminal de eNOS y nNOS sólo cumplen de forma parcial estos requerimientos ya que un residuo ácido, Glu, está presente en la posición (-3) de PKD1/PKD2 y un residuo básico, Arg, está presente en posición (-5) en la eNOS. Sin embargo, el extremo C-terminal de estas proteínas es sustrato de PKD1. En el caso de PKD1, la Ser916 presente en su extremo C-terminal puede ser no sólo autofosforilada por PKD1 activa, sino que también puede ser transfosforilada por otras moléculas de PKD1 (Sanchez-Ruiloba et al., 2006). En el caso del extremo C-terminal de la eNOS, PKD1 fosforila la Ser1179 *in vitro* pero también *in vivo*, como se demostrará a continuación. Además, varios de los aminoácidos presentes en la secuencia de eNOS que es reconocida por PKD1 son idénticos a los que aparecen en otros sustratos conocidos de PKD. Además del residuo de Arg conservado en posición (-3), la secuencia de fosforilación de la eNOS muestra una Thr en posición (-2) (como en el caso de HDAC5 o PI4KIIIb), un Gln en posición (-1) (como en el caso de HDAC5) y una Phe en posición (+1) (como en el caso de Kidins220) (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia consenso de fosforilación por PKD y sitios de fosforilación en diversos sustratos de PKD conocidos. La Ser fosforilable (pS) se encuentra en posición (0); la posición (-3) la ocupa generalmente un residuo básico (Arg/Lys) mientras que en la posición (-5) suele encontrarse un residuo hidrofóbico (preferentemente Leu/Val/Ile).

Proteína sustrato	-5	-4	-3	-2	-1	pSer	+1	+2
Kiddins220	Ile	Thr	Arg	Gln	Met	Ser	Phe	Asp
RIN1	Leu	Arg	Arg	Glu	Ser	Ser	Val	Gly
Rhotekin	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Leu	Tyr
Cortactin	Leu	Ala	Lys	His	Glu	Ser	Gln	Gln
Hsp27	Leu	Ser	Arg	Gln	Leu	Ser	Ser	Gly
SSH1L	Leu	Lys	Arg	Ser	His	Ser	Leu	Ala
Hsp27	Leu	Ser	Arg	Gln	Leu	Ser	Ser	Gly
PI4K IIIb	Leu	Lys	Arg	Thr	Ala	Ser	Asn	Pro
HDAC5	Leu	Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Ser	Pro
Snail1	Leu	Val	Arg	Lys	Pro	Ser	Asp	Pro
PKD1	Leu	Ser	Glu	Arg	Val	Ser	Ile	Leu
PKD2	Leu	Ala	Glu	Arg	Ile	Ser	Val	Leu
eNOS	Arg	Ile	Arg	Thr	Gln	Ser	Phe	Ser
nNOS	Arg	Leu	Arg	Ser	Glu	Ser	Ile	Ala
consenso	Leu/Ile		Arg/Lys			Ser		

2. La fosforilación de la eNOS en la Ser1179 por parte de PKD1 o PKD2 da lugar a un aumento en la síntesis de óxido nítrico.

Con el fin de confirmar que en células endoteliales la sobreexpresión de PKD1 y PKD2 conducía a la fosforilación de la eNOS se transfectaron ambas quinasas y se determinó el grado de fosforilación en en Ser1179. Tal y como muestra la Figura 16, tanto PKD1 como PKD2 son capaces de aumentar significativamente la fosforilación de la eNOS en Ser1179. Como medida indirecta de los niveles de •NO determinamos los niveles de fosforilación de VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*), el miembro arquetípico de la familia de proteínas de unión a actina ya que está bien establecido que su fosforilación en Ser239 es reflejo de los niveles de óxido nítrico (Sartoretto et al., 2009). Tal y como muestra la figura 16, la fosforilación de eNOS mediada por PKD1 y PKD2 conduce a un aumento en la síntesis de •NO ya que es posible detectar mayores niveles de VASP fosforilado, lo cual es indicativo de la activación de la ruta del cGMP/PKG. Estos resultados demuestran que la ruta VEGF/PKD probablemente juegue un papel decisivo en la regulación de la producción de •NO en el endotelio.

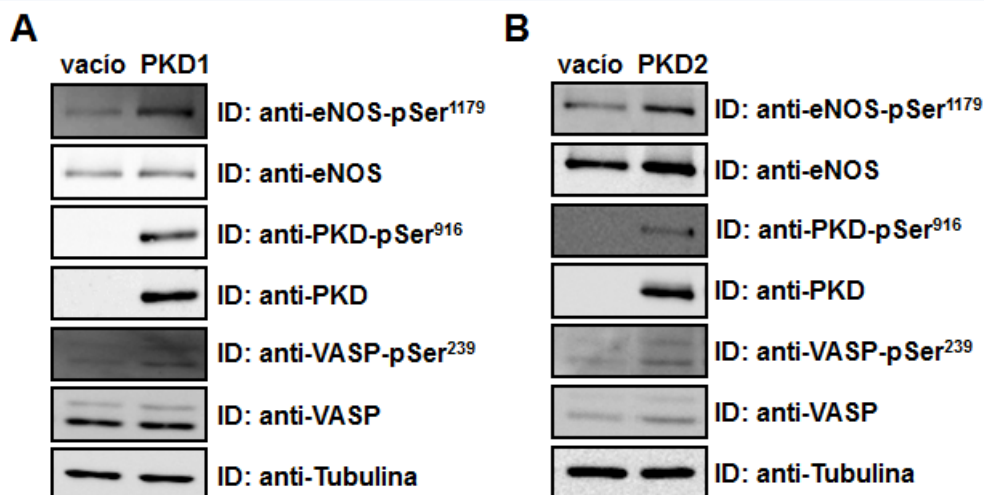


Figura 16. En células BAEC, la sobreexpresión tanto de PKD1 como de PKD2 aumenta la fosforilación de la eNOS en la Ser1179, lo que conduce a un aumento de la producción de \bullet NO, a la subsiguiente señalización vía cGMP/PKG y a la fosforilación de VASP en la Ser239, un marcador bioquímico de los niveles de \bullet NO en células vivas. Células BAEC se transfectaron con el vector pcDNA3 vacío o con PKD1 silvestre (PKD1) (panel A) o con PKD2 silvestre (PKD2) (panel B). 24 h después de la transfección se reemplazó el medio por medio fresco sin FBS con extra L-Arg (5 mM) y BH_4 (15 μM) y un día más tarde las células se trataron (+) o no (-) con PDBu 1 μM durante 15 min, seguido de la lisis y del análisis de los lisados totales mediante inmunodetección (ID). Se analizaron los niveles de expresión de eNOS-pSer¹¹⁷⁹, eNOS total, PKD-pSer⁹¹⁶, PKD total, VASP total y tubulina en los lisados totales. Como medida de la señalización activada por la producción de \bullet NO, se empleó la detección de VASP fosforilada en la Ser239 (VASP-pSer²³⁹) que aparece como un doblete de 45 kDa y 50 kDa. Se muestran los *blotting* representativos de tres experimentos independientes. La sobreexpresión tanto de PKD1 como de PKD2 aumenta la fosforilación de la eNOS en la Ser1179, lo que conlleva un aumento de la actividad de la eNOS, que produce mayores niveles de \bullet NO y como consecuencia aumentan los niveles de VASP-pSer²³⁹, lo que indica que la activación de la eNOS, la producción de \bullet NO y la estimulación de la vía de señalización cGMP/PKG está bajo el control de la actividad de PKD también en células BAEC.

Para comprobar que el VEGF induce la activación de eNOS en células endoteliales, estudiamos la fosforilación de eNOS en la Ser1179 en células BAEC en respuesta a la estimulación con VEGF. El tratamiento con VEGF (10 ng/ml) induce rápidamente la fosforilación de la eNOS, aumentando con el tiempo hasta los 30 min ensayados (Figura 17A). La fosforilación de eNOS se determinó mediante el anticuerpo comercial que reconoce esta serina fosforilada y se valoraron los niveles de expresión de eNOS total para verificar que los cambios en la fosforilación no se debían a una cantidad desigual de eNOS total. Esto se puede correlacionar con el rápido aumento en la fosforilación y activación de PKD inducido por VEGF a partir de 2 min que alcanza un máximo entre 15 y 45 min en analogía a lo observado por Wong y colaboradores (Wong y Jin, 2005), quienes estudiaron de una forma similar la activación de PKD inducida por VEGF en células BAEC, valorando la fosforilación de PKD tanto en el lazo catalítico (pPKD-Ser744/748) como en la Ser916.

Además, el tratamiento de las células BAEC con el éster de forbol PDBu, de manera que la activación de la ruta PKC diera lugar a la activación de las PKD que se encuentran por debajo de la ruta, también condujo al aumento de la fosforilación de la eNOS endógena en la Ser1179 (Figura 17B). Estos resultados confirman que PKD también desempeña un papel importante en dicha fosforilación y por tanto en la activación de la eNOS.

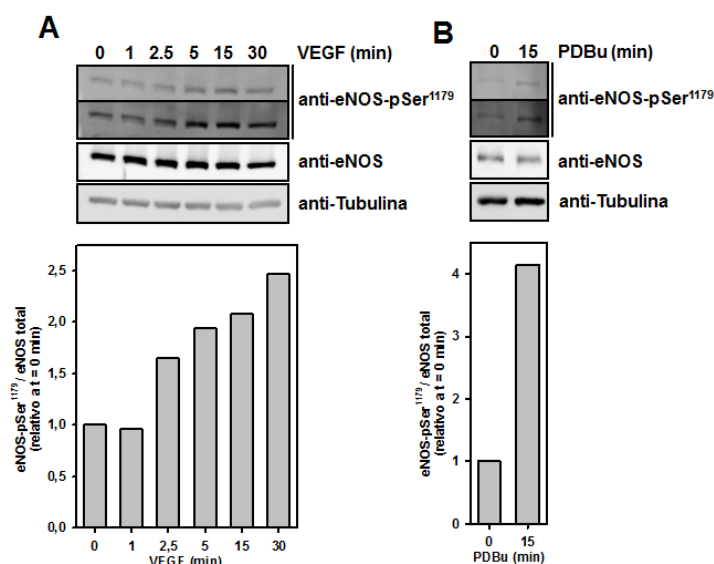


Figura 17. Cambios en la fosforilación de la Ser1179 de la eNOS endógena en células BAEC, tras la estimulación con VEGF o PDBu a distintos tiempos. Se sembraron células endoteliales bovinas de aorta (BAEC) y 24 h después se reemplazó el medio por medio sin FBS. Al día siguiente, las células se estimularon con VEGF (10 ng/ml) (Panel A) durante los tiempos indicados o se trataron con PDBu (1 μ M) durante 15 min (Panel B) y los lisados se analizaron mediante inmunodetección valorándose eNOS-pSer¹¹⁷⁹, eNOS total y tubulina. Como se ha descrito previamente, la estimulación de las células endoteliales con VEGF aumenta la fosforilación de la eNOS en la Ser1179. El activador de PKD, el ester de forbol PDBu, también conlleva un aumento de dicha fosforilación. Los gráficos inferiores representan la cuantificación de los *blotting* y corresponden al cociente eNOS-pSer¹¹⁷⁹/eNOS total, expresados de forma relativa al valor obtenido a tiempo 0 min (al que se ha asignado el valor de 1), que representa la fosforilación basal por diferentes quinasas intracelulares que convergen en la Ser1179. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Para validar los resultados obtenidos en células endoteliales, se comprobó si la eNOS era también sustrato de PKD1 y PKD2 en células HEK293T, para lo que se cotransfectaron la eNOS silvestre o el mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala (eNOS^{SA}) junto con PKD1 y PKD2 silvestres (GFP-PKD1wt o GFP-PKD2wt) (Figura 18A). En un segundo experimento, se cotransfectaron células HEK293T con la eNOS silvestre o con el mutante no fosforilable (eNOS^{SA}) y con tres construcciones de PKD1: PKD1wt, un mutante constitutivamente activo de PKD1 fusionado a GFP (GFP-PKD1ca) o un mutante inactivo (GFP-PKD1ki) (Figura 18B). En concordancia con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas, se detectó que si bien en ausencia de PKD existe una fosforilación basal de la eNOS silvestre en la Ser1179, debido a la existencia de numerosas quinasas que convergen en esa posición, la sobreexpresión de PKD1 o PKD2 silvestres aumenta la fosforilación en la Ser1179 (Figura 18A). El aumento en la señal de fosforilación fue mayor cuando se sobreexpresó PKD1 constitutivamente activa y disminuyó al transfectar la PKD1 inactiva (Figura 18B). La disminución de la señal al transfectar la construcción PKD1ki demuestra que la estimulación de esta vía se ve obstaculizada cuando la actividad de PKD1 está comprometida. La eNOS se fosforila *in vivo* en la Ser1179 sólo en aquellas células que han sido transfectadas con la eNOS silvestre, pero no se detectó señal en las células transfectadas con el mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala.

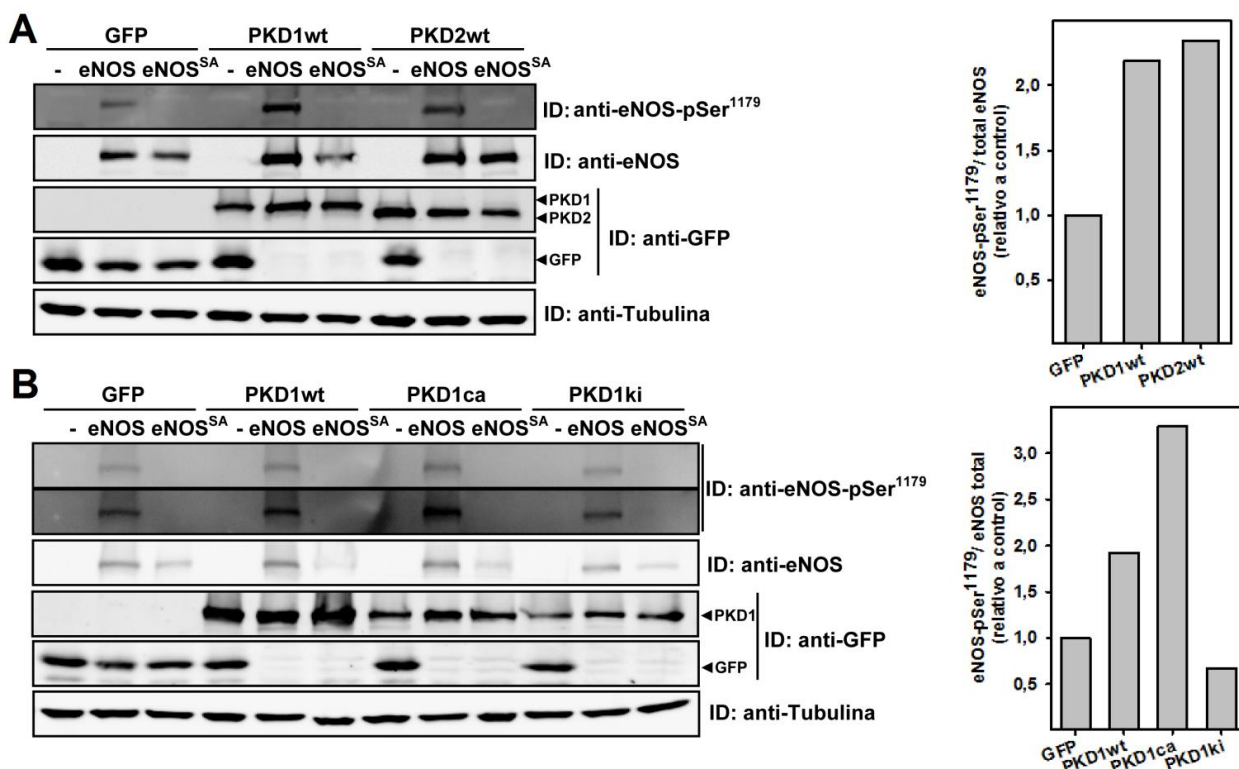


Figura 18. *In vivo*, PKD1 y PKD2 fosforilan a la eNOS en la Ser1179. (A) Células HEK293T se cotransfectaron con el vector pEFBOS-GFP (-), con GFP-PKD1 (PKD1wt) o GFP-PKD2 (PKD2wt) silvestres clonadas en dicho vector, junto con eNOS completa silvestre o su mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala (eNOS^{SA}). (B) Células HEK293T se cotransfectaron con el vector pEFBOS-GFP (-), con GFP-PKD1 (PKD1wt), con el mutante de PKD1 constitutivamente activo (PKD1ca) o con el mutante quinasa inactivo de PKD1 (PKD1ki) clonados en el vector pEFBOS junto con eNOS completa silvestre o su mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala (eNOS^{SA}). En ambos experimentos, 24 h después de la transfección se reemplazó el medio por medio sin FBS. Un día más tarde, las células se lisaron y los lisados totales se analizaron mediante inmunodetección (ID). La detección de eNOS fosforilada en la Ser1179 se determinó mediante un anticuerpo fosfoespecífico (eNOS-pSer¹¹⁷⁹). El panel inferior de eNOS-pSer¹¹⁷⁹ en la figura B corresponde a una exposición más larga. Se hizo *stripping* de la membrana para incubarla con el anticuerpo frente a eNOS, para confirmar que las diferencias en fosforilación no se debían a una carga desigual. También se muestran los niveles de GFP, PKD y tubulina en los lisados totales. Se muestran los *blotting* representativos de tres experimentos independientes. Los gráficos de la derecha representan las cuantificaciones de los *blotting* mostrados, para lo que se calculó el cociente eNOS-pSer¹¹⁷⁹/eNOS total, y se expresó de forma relativa al valor obtenido en células transfectadas con eNOS y GFP (al que se ha asignado el valor de 1), que representa la fosforilación basal por diferentes quinasas celulares.

Como se acaba de ver, la fosforilación de la eNOS en Ser1179 en el endotelio conduce a su activación, hecho que indirectamente se pudo determinar mediante un aumento en la fosforilación de VASP. Con el fin de demostrar la activación de la eNOS al producirse su fosforilación en Ser1179 por parte de la PKD se llevó a cabo una determinación de la señal de fluorescencia del DAF en células COS-7 transfectadas con diversas construcciones de manera que pudieran detectarse cambios en los niveles de •NO de una forma más directa (Figura 19). Mientras que las células COS-7 sin transfectar o las transfectadas con el mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala (eNOS^{SA}) apenas liberan •NO, las células transfectadas con la eNOS silvestre (eNOSwt) mostraban actividad incluso en ausencia de ionóforos. En este sistema modelo, la cotransfección de la eNOS con PKD1 da lugar a un significativo aumento en los

niveles de $\bullet\text{NO}$ detectados, incluso en ausencia de activadores de la quinasa como el PDBu o el VEGF, si bien el tratamiento con dichos activadores aumenta los niveles de $\bullet\text{NO}$ detectados.

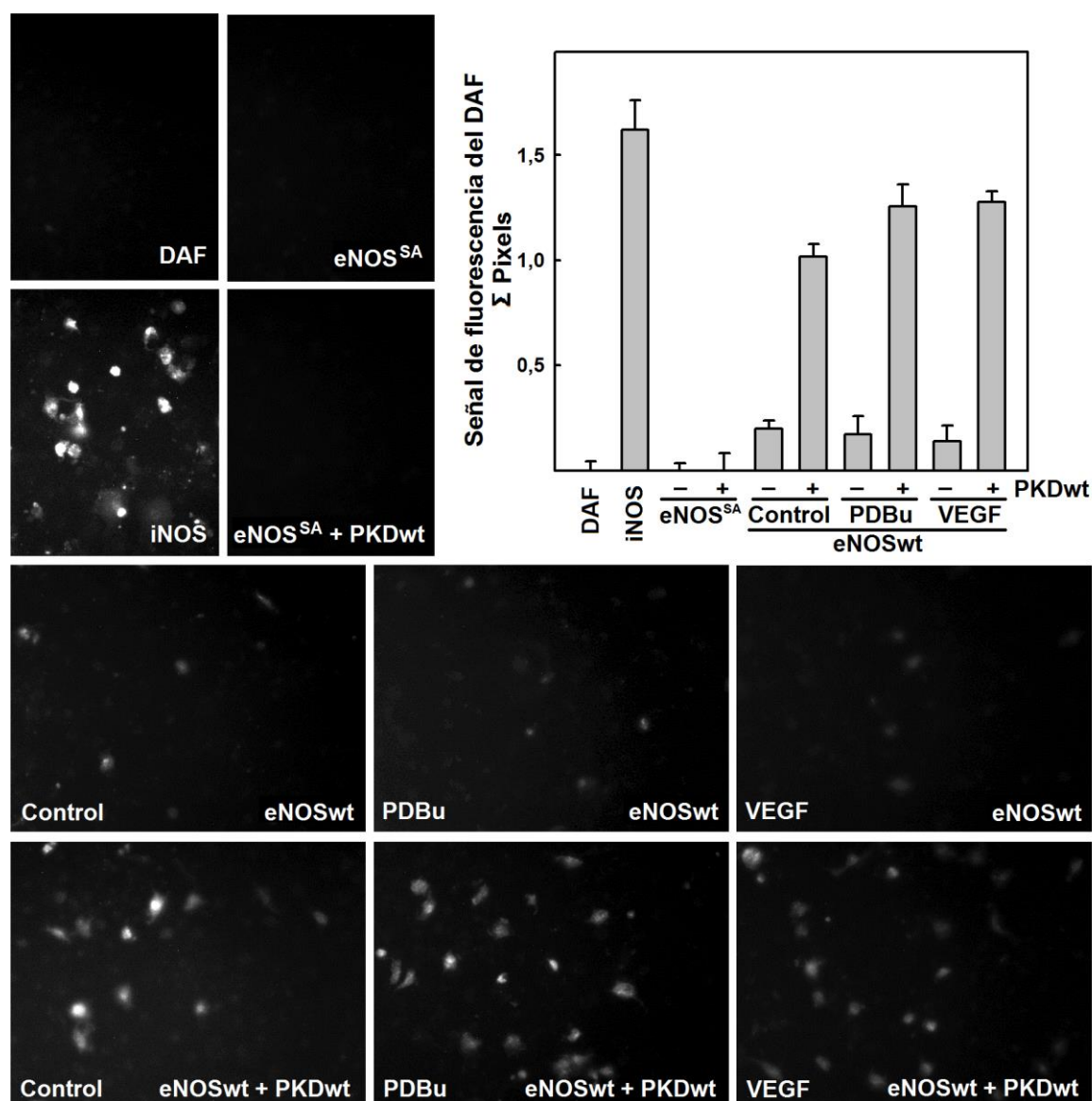


Figura 19. La fosforilación de la eNOS por PKD1 conlleva su activación y un consiguiente aumento de la síntesis de $\bullet\text{NO}$. Se transfirieron células COS-7 con la eNOS completa silvestre (eNOSwt) o con el mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala (eNOS^{SA}), en ausencia o presencia de PKD1wt clonada en el vector pcDNA3. Como control positivo, se transfirió un pocillo con la iNOS ya que produce grandes cantidades de $\bullet\text{NO}$, y como control negativo se transfirió otro pocillo con el plásmido pcDNA3 vacío (denominado DAF). Al día siguiente se cambió el medio a las células a su medio normal con extra L-Arg (5 mM) y BH₄ (15 μM). 48 h después de la transfección se lavaron las células con medio y se incubaron con la sonda fluorescente sensora de $\bullet\text{NO}$, DAF2-DA, a concentración 25 μM . El $\bullet\text{NO}$ producido por las células se dejó reaccionar con el DAF durante al menos 3 horas tras lo cual se lavaron y a continuación se trataron o no con PDBu 1 μM , o con VEGF 10 ng/ml, durante 1 h en la estufa. A continuación, la monocapa se lavó exhaustivamente con medio y se detectó la fluorescencia entre 505 y 525 nm previa excitación a 488 nm. Se fotografiaron un mínimo de 4 campos amplios de la monocapa, de más de 400 células cada uno. Se muestra un campo representativo de cada una de las condiciones. La fluorescencia se cuantificó mediante la determinación de la intensidad de los píxeles y en cada caso se restó el valor de la fluorescencia correspondiente a las células trasfectadas con el plásmido vacío (DAF). Los datos corresponden a la media \pm S.D. para cuatro determinaciones. *, $p < 0.05$ con respecto a las células trasfectadas con el plásmido vacío (DAF).

3. El tratamiento de células BAEC que sobreexpresan PKD con VEGF ocasiona una rápida translocación de la eNOS endógena, así como de la PKD, mientras que el tratamiento con PDBu, moviliza la PKD sin que la eNOS modifique su localización.

Se estudió el efecto ocasionado en la localización subcelular de la eNOS endógena y de la PKD1 o PKD2 sobreexpresada en células endoteliales tras el tratamiento con VEGF o con PDBu (Figura 20).

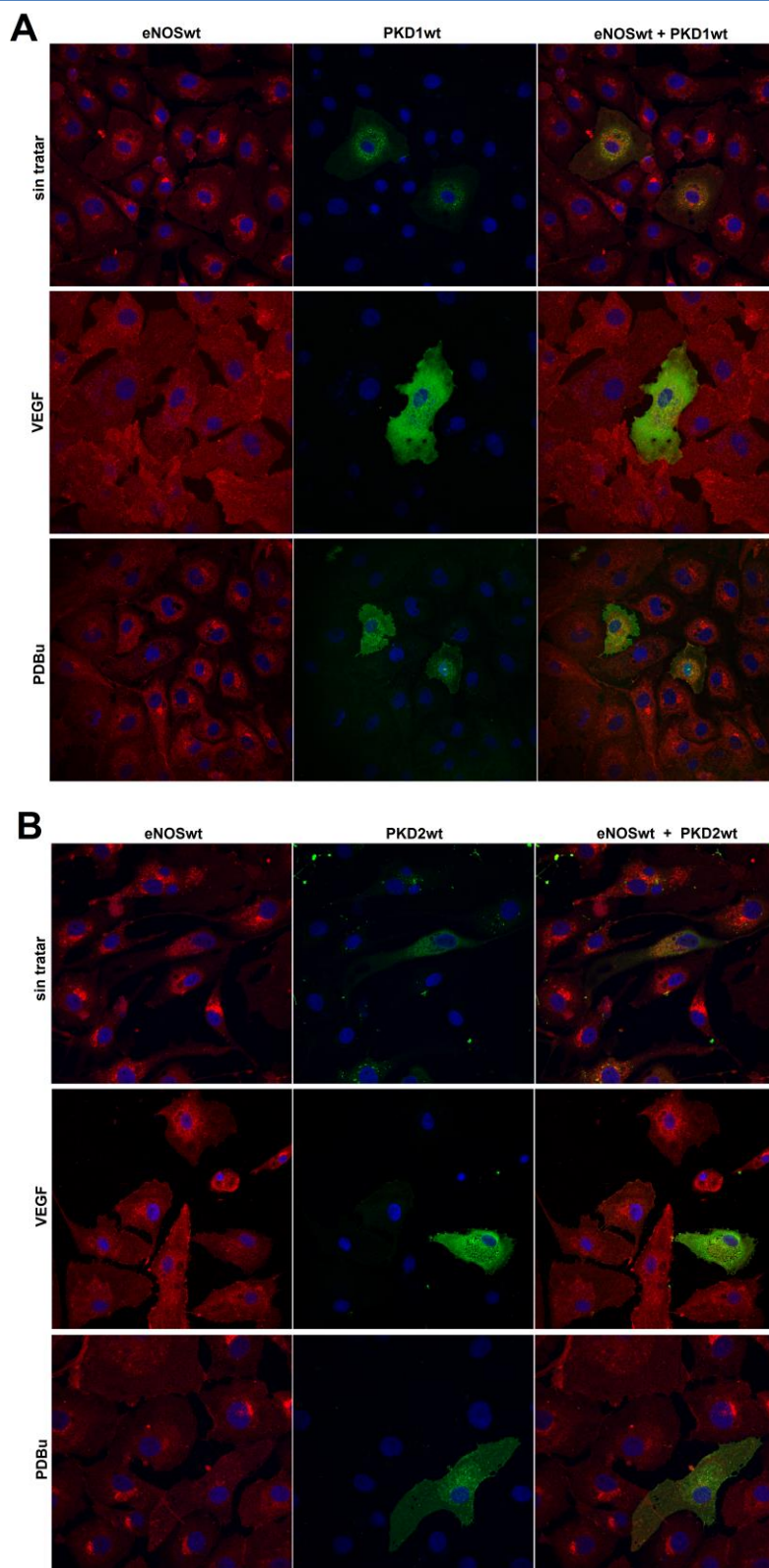


Figura 20. Se sembraron células BAEC sobre cristales y se transfectaron con GFP-PKD1 (Figura 20A) o GFP-PKD2 (Figura 20B) silvestres. 24h después de la transfección se reemplazó el medio por medio sin FBS, y 24 h más tarde se trataron las células con VEGF (10 ng/ml) o PDBu (1 μ M) durante 15 minutos. La localización subcelular de la eNOS y de la PKD se analizó mediante microscopía confocal, para lo que realizaron las inmunofluorescencias tal y como se ha descrito en el apartado de Métodos. Brevemente, tras lavar las células con PBS, se permeabilizaron con metanol y se fijaron con paraformaldehído al 2%. La presencia de la eNOS se detectó con el anticuerpo policlonal anti-eNOS y posterior incubación el anticuerpo secundario Cy3 (rojo); cada una de las isoformas de PKD estaba fusionada a la GFP por lo que no se requirió el empleo de anticuerpos para su detección. La tinción de los núcleos se llevó a cabo con DAPI. El tratamiento de las células BAEC con VEGF, induce una rápida translocación de la eNOS desde el Golgi, donde se localiza principalmente en condiciones basales, hacia la membrana plasmática, y este tratamiento también afecta a la localización de la PKD. El tratamiento con PDBu, induce una movilización de la PKD hacia la membrana plasmática, sin afectar a la localización de la eNOS.

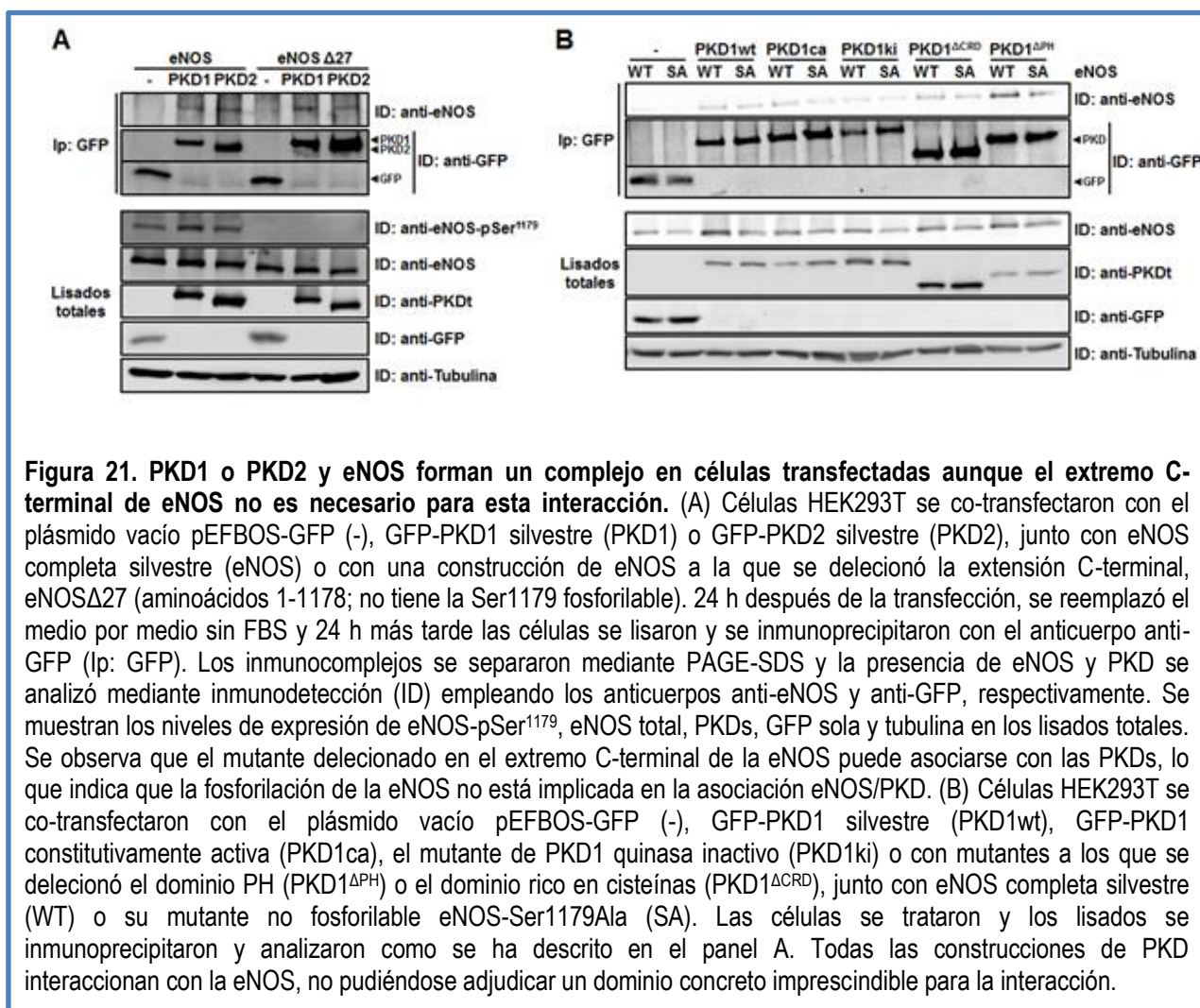
Si bien el tratamiento de las células BAEC con VEGF, induce una rápida translocación de la eNOS desde el Golgi, donde se localiza principalmente en condiciones basales, hacia la membrana plasmática, como de la PKD, el tratamiento con PDBu, únicamente afecta a la localización de la PKD que se moviliza hacia la membrana plasmática, sin afectar a la localización de la eNOS.

4. PKD y eNOS forman un complejo en células transfectadas que implica al dominio NADPH de eNOS, aunque su extremo C-terminal no es necesario para esta interacción.

Algunas de las quinasas que fosforilan a la eNOS en serina o treonina físicamente interaccionan con la enzima a través de la unión con Hsp90 (Fontana et al., 2002). En este sentido se ha descrito que Akt inmunoprecipita con eNOS en células BAEC y viceversa, eNOS inmunoprecipita con Akt, lo que indica que ambas enzimas se asocian *in vivo* (Michell et al., 1999). Con el fin de determinar si PKD y eNOS podían asociarse cuando se transfectaban en células de mamífero se cotransfectaron células HEK293T con eNOS silvestre o un mutante deleciónado en el extremo C-terminal (eNOS Δ 27) que perdía el sitio de fosforilación, junto con GFP-PKD1 y GFP-PKD2 silvestres (PKD1 o PKD2). Dos días después de la transfección se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la PKD a partir del lisado total empleando el anticuerpo anti-GFP y la presencia de eNOS en los inmunocomplejos se detectó con el anticuerpo anti-eNOS (Figura 21A). Los resultados muestran que la eNOS silvestre y ambas isoformas de PKD se asocian y la fosforilación no está implicada en la asociación eNOS/PKD, pues el mutante deleciónado de eNOS que pierde el sitio de fosforilación sigue interaccionado con PKD.

Para intentar encontrar la región de la eNOS implicada en la asociación con PKD1, de nuevo se cotransfectaron células HEK293T con PKD1 wt, en presencia o ausencia de PDBu, o su plásmido vacío, junto con distintas construcciones de eNOS: eNOS completa, el mutante deleciónado en el extremo C-terminal (eNOS Δ 27), el dominio NADPH (aa 988-1205) o el dominio hemo-oxigenasa (HEMO, aa 1-521), así como el vector vacío ("vacío") (Figura 22). Dos días después de la transfección y antes de lisar las células, fueron tratadas o no con PDBu durante 15 min para activar PKD1. A continuación, los lisados

fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-eNOS y revelados con los anticuerpos anti-PKD, para detectar la presencia de PKD1 wt y anti-eNOS para comprobar que la eNOS había sido inmunoprecipitada correctamente. Podemos ver que la activación de la PKD con PDBu, si bien aumenta los niveles de fosforilación de la eNOS, no aumenta la asociación entre eNOS/PKD1 y esta asociación, que como ya se ha comentado no está ligada al proceso de fosforilación ya que el mutante de la eNOS delecionado en el extremo C-terminal que ha perdido el sitio de fosforilación sigue interaccionando con PKD, implica al dominio NADPH de la eNOS, pues con este fragmento sigue inmunoprecipitando PKD, pero no lo hace cuando se transfecta el dominio hemo. Además, incluso en ausencia de tratamiento con PDBu, la PKD1wt transfectada es activa ya que está fosforilada en la Ser916, lo que explica el aumento en la fosforilación de eNOS en la Ser1179 cuando se co-transfecta con PKD1wt pero no se trata con PDBu.



Se siguió estudiando la participación de los distintos dominios de PKD1 que pudieran mediar esta asociación, para lo que, además de la PKD1 silvestre y sus mutantes constitutivamente activo y el quinasa inactivo, se transfectaron los dos mutantes de GFP-PKD1 a los que se había delecionado o el dominio de homología a pleckstrina (PH) o el dominio rico en cisteínas (CRD), llamados PKD1 Δ PH y

PKD1^{ΔCRD}, respectivamente, junto con la eNOS silvestre y el mutante no fosforilable. A continuación, los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-GFP, que permite inmunoprecipitar las distintas construcciones de PKD y revelados con los anticuerpos anti-eNOS, para detectar la existencia de interacción y anti-GFP para comprobar que los distintos mutantes de PKD habían sido inmunoprecipitados correctamente. Tanto el mutante de PKD1 al que se le ha delecionado el dominio CRD como al que se le ha delecionado el dominio PH se asocian con la eNOS (Figura 21B), por lo que ninguno de esos dos dominios está implicado en la interacción con la eNOS, a no ser que existan distintas zonas implicadas en la asociación y ambos estén implicados.

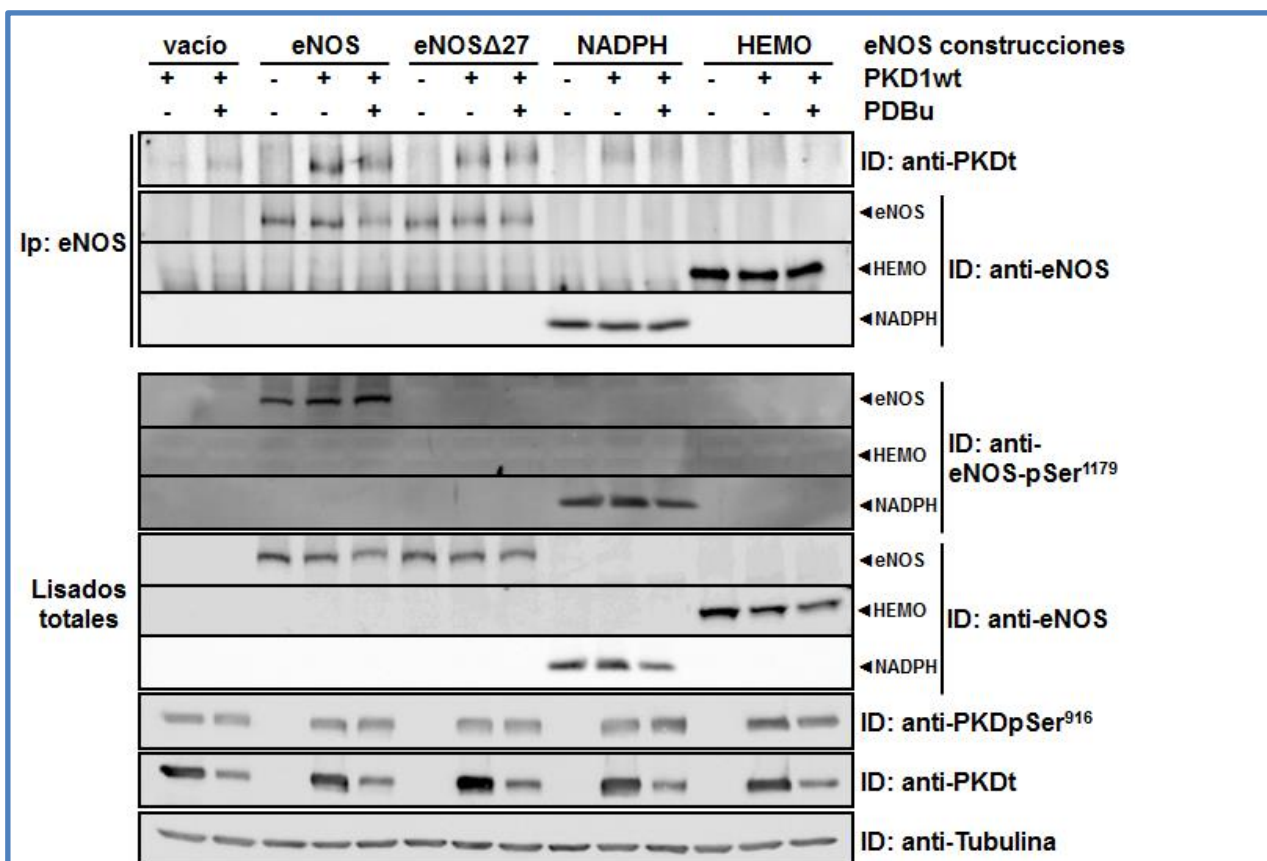


Figura 22. El tratamiento con PDBu aumenta la fosforilación de eNOS en la Ser1179 por PKD1wt, pero no favorece la asociación entre eNOS/PKD1; para esta asociación se requiere la presencia del dominio NADPH de eNOS. Células HEK293T se co-transfectaron con el vector vacío pcDNA3 o con PKD1 silvestre clonada en este vector [signos (-) o (+) en la línea de PKD1wt] junto con diferentes construcciones de eNOS: eNOS completa (eNOS), un mutante de eNOS delecionado en el extremo C-terminal (eNOSΔ27, aa 1-1178), el dominio NADPH (aa 988-1205) o el dominio hemo-oxigenasa (HEMO, aa 1-521), así como el vector vacío ("vacío"). 24 h después de la transfección el medio se cambió por medio sin FBS y 24 h más tarde las células se trataron (+) o no (-) con PDBu 1 μM durante 15 min, seguido de la lisis e inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal de conejo anti-eNOS (Ip: eNOS). Los inmunocomplejos se separaron mediante PAGE-SDS y la presencia de eNOS y PKD se analizó mediante inmunodetección (ID) empleando los anticuerpos anti-eNOS y anti-PKD, respectivamente. Se analizaron los niveles de expresión de eNOS-pSer¹¹⁷⁹, eNOS total, PKD-pSer⁹¹⁶, PKD total y tubulina en los lisados totales. Se observa que el tratamiento con PDBu aumenta aún más la fosforilación de la Ser1179 de la eNOS bovina. Además, incluso en ausencia de tratamiento con PDBu, la PKD1wt transfectada es activa ya que está fosforilada en la Ser916, lo que explica el aumento en la fosforilación de eNOS en la Ser1179 cuando se co-transfecta con PKD1wt pero no se trata con PDBu. El aumento en la fosforilación de PKD1 inducido tras el tratamiento con PDBu, interfiere en la detección por su anticuerpo, que reconoce el epítipo C-terminal de PKD1. El mutante delecionado en el extremo C-terminal de la eNOS puede asociarse con PKD1wt, lo que indica que la fosforilación de la eNOS no está implicada en la asociación eNOS/PKD; la interacción es mediada por el dominio NADPH sin implicación del dominio hemo-oxigenasa.

5. Ensayo de reparación de herida: el tratamiento de las células BAEC con un inhibidor específico de PKD disminuye su migración *in vitro*.

A continuación se estudió el papel de PKD en la migración de las células endoteliales, una etapa importante en el proceso de angiogénesis. Se sabe que el silenciamiento de PKD2 en células HUVEC inhibe la proliferación, la migración y la angiogénesis *in vitro* (Hao et al., 2009) y que el •NO producido por la eNOS desempeña un papel clave en la angiogénesis post-natal ya que media señales desencadenadas por factores angiogénicos, es fundamental para el desarrollo de la vasculatura de los pulmones en el feto y la morfogénesis del pulmón en ratones (Han y Stewart, 2006), es importante para la formación colateral y la angiogénesis post-isquemia (Murohara et al., 1998), de modo que los efectos positivos del •NO en la supervivencia de las células endoteliales es probable que contribuyan a los efectos pro-angiogénicos del •NO (Dimmeler y Zeiher, 1999).

Mediante un ensayo de reparación de herida, se valoró la capacidad de migración durante 24 horas, de las células endoteliales BAEC inducida por VEGF (10 ng/ml) o PDBu (1 μ M), tras el tratamiento con el inhibidor de eNOS L-NAME (500 μ M) (Figura 23A). Las células BAEC sin tratar (control), por sí mismas tienden a recubrir el área de la herida y esta capacidad se ve parcialmente disminuida cuando se tratan con el inhibidor de la eNOS, L-NAME. Como era de esperar, el tratamiento con el factor pro-angiogénico VEGF induce la fosforilación y activación de la eNOS, lo que conlleva un aumento en la capacidad de migración de las células endoteliales. El mismo efecto, incluso potenciado, se observa cuando las células se tratan con el activador de PKD, el éster de forbol PDBu, que como hemos visto induce no sólo la ya conocida activación de PKD, sino también un aumento en la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 activadora (Figura 17B). El pre-tratamiento de las células con el inhibidor de la eNOS L-NAME, bloquea la capacidad de migración inducida tanto por VEGF como por PDBu. Cuando las células BAEC se pretrataron con el inhibidor de PKD Gö6976 o un inhibidor de PKD específico (Figura 23B), se observó que la capacidad de migración inducida por PDBu se veía disminuida, de forma más acusada que tras el tratamiento con inhibidores de la quinasa Akt.

Estos resultados demuestran que la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 por PKD, tiene un efecto activador y el aumento de los niveles de •NO potencia la capacidad de migración de las células endoteliales, etapa clave para el proceso de angiogénesis. Esta capacidad de migración se ve atenuada no sólo al inhibir a la eNOS con el inhibidor L-NAME, sino en una etapa previa, bloqueando su activación al inhibir la PKD, que ya no la puede fosforilar en la Ser1179 activadora.

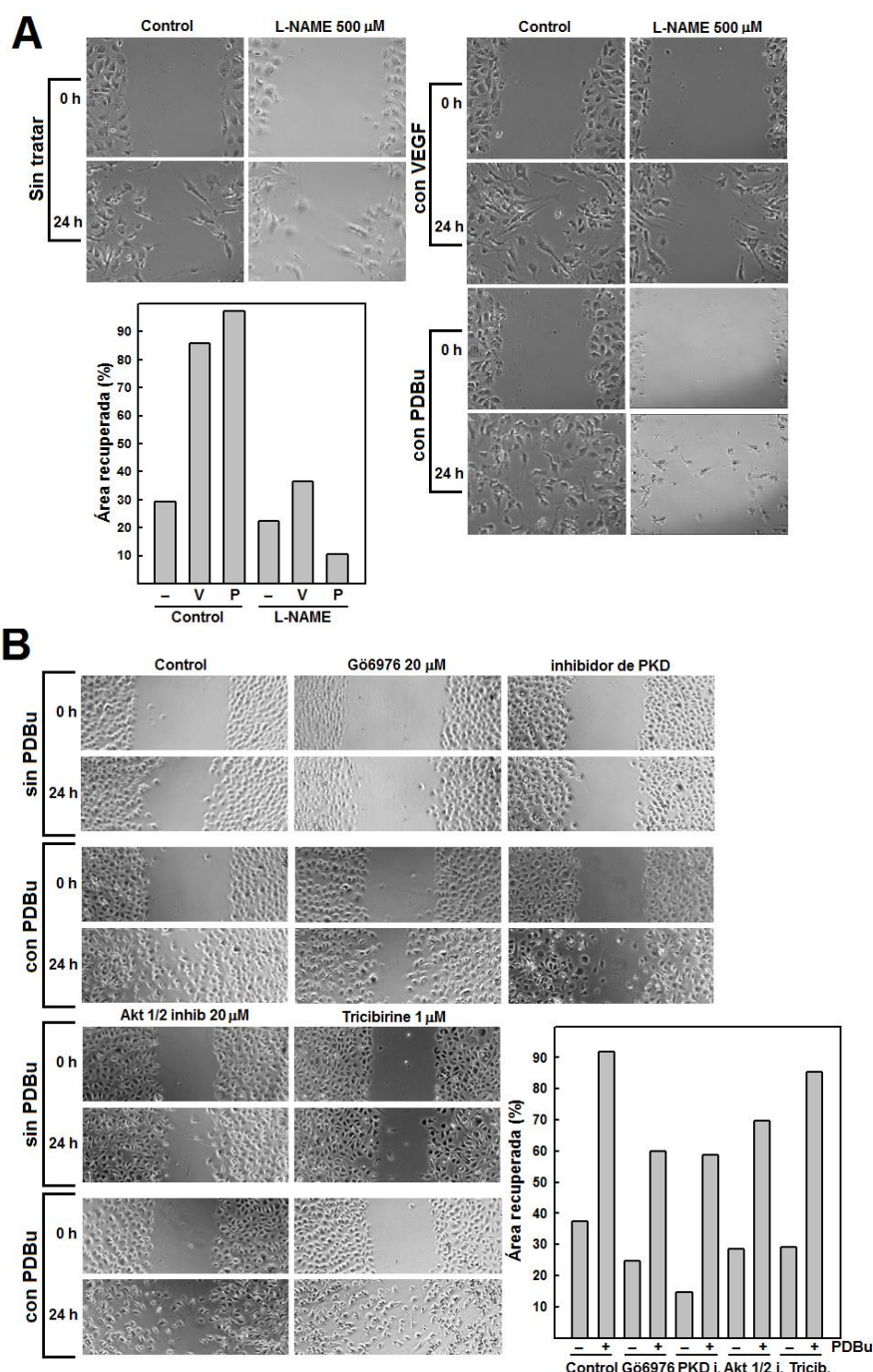


Figura 23. El tratamiento de las células endoteliales BAEC con el inhibidor de eNOS L-NAME disminuye su capacidad de migración que es estimulada por VEGF o PDBu, y el tratamiento con los inhibidores de PKD Gö6976 y un inhibidor específico, disminuye su capacidad de migración estimulada por PDBu en mayor medida que el tratamiento con inhibidores de Akt. Se realizó un ensayo de reparación de herida (*wound healing*). Se sembraron células BAEC y al día siguiente, las monocapas confluentes se incubaron con medio en ausencia de FBS. Dos días después de su siembra, se cambió de nuevo el medio a medio sin FBS con extra L-Arg (5 mM) y BH₄ (15 μM) y se preincubaron con (Panel A) el inhibidor de eNOS (500 μM) durante 1 h en la estufa o (Panel B) con los inhibidores de PKD Gö6976 (20 μM) o con un inhibidor específico (PKD i.) o con los inhibidores de Akt Akt 1/2 inhibidor (20 μM) o Tricibirine (1 μM), antes de añadir o no VEGF (10 ng/ml) o PDBu (1 μM), en presencia de los inhibidores. Inmediatamente realizado este último tratamiento, se realizó la “herida” que consistió en una brecha trazada a lo largo del pocillo con una punta común de 10 μl. Las placas se instalaron en un microscopio con regulación de la temperatura a 37°C y se realizó una foto del área seleccionada de cada pocillo, cada 30 min durante 24 h. El efecto de reparación de la herida se calculó como porcentaje de recuperación del área con respecto al área inicial de la herida (gráfico de la derecha) con la fórmula que se ha indicado en el apartado de métodos.

BLOQUE 2: La fosforilación de la Ser1412 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS) y la producción de •NO

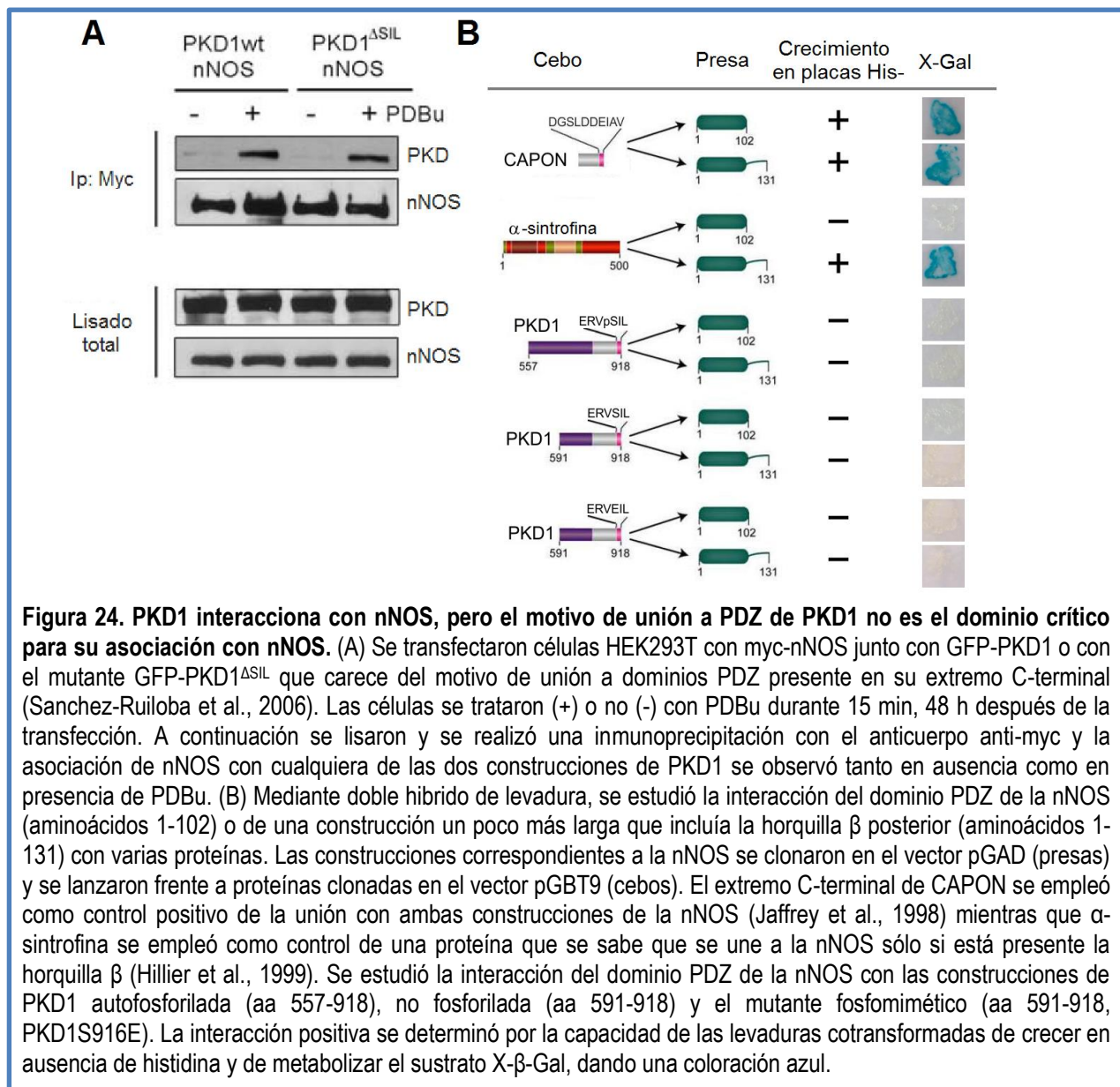
1. PKD1 y nNOS forman un complejo en células transfectadas aunque el extremo C-terminal de PKD1 no es necesario para esta interacción.

Dado que tanto nNOS como PKD1 están presentes en la densidad post-sináptica de las neuronas, en primer lugar se estudió si ambas proteínas podían asociarse cuando se transfectaban en células de mamífero. Para ello, se cotransfectaron células HEK293T con myc-nNOS y GFP-PKD1 silvestre (PKD1 wt) o con un mutante cuyo extremo C-terminal había sido deletado (PKD1^{ΔSIL}). Dos días después de la transfección y antes de su lisis, las células fueron tratadas o no durante 15 min con un activador de PKD, el éster de forbol PDBu. A continuación se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la nNOS a partir del lisado total empleando el anticuerpo anti-myc y la presencia de GFP-PKD1 en los inmunocomplejos se detectó con el anticuerpo anti-GFP (Figura 24A). Los resultados muestran que nNOS y PKD1 wt se asocian y esta asociación se ve incrementada por el tratamiento con PDBu, incluso con el mutante de PKD1 que carece de su motivo C-terminal (–SIL). Además, este resultado indica que la activación de PKD1 potencia la formación del PKD1/nNOS *in vivo*.

Posteriormente y mediante ensayo de doble híbrido de levadura, se estudió si existía una interacción directa entre el dominio PDZ de la nNOS y el extremo C-terminal de PKD1. Las proteínas conocidas que interaccionan con el dominio PDZ de la nNOS deben tener un aminoácido hidrofóbico como Val, Leu o Ile en la posición final así como un residuo ácido en posición (-2) o (-3) (Schepens et al., 1997; Stricker et al., 1997). El extremo C-terminal de PKD1 posee un motivo -VSIL, en el que el residuo Ser se autofosforila cuando la enzima es activa (Iglesias et al., 1998b). Como era de esperar, tanto el dominio PDZ de la nNOS aislado (aminoácidos 1-102) como la construcción más larga que incluye la horquilla β (aminoácidos 1-131), unen fuertemente el extremo C-terminal de CAPON (Jaffrey et al., 1998), una proteína que tiene un residuo ácido en posición (-3) (Figura 24B). Por otro lado, la α1-sintrofina, puede asociarse únicamente con la construcción de nNOS que incluye la horquilla β, en concordancia con la interacción PDZ/PDZ previamente descrita (Hillier et al., 1999). Para estudiar la posible unión del motivo PDZ fosforilado de PKD1 activa con el dominio PDZ de la nNOS en primer lugar se clonó el dominio catalítico activo completo de PKD1 (aa 557-918), que contiene el motivo PDZ autofosforilado (-VS⁹¹⁶IL) en su extremo C-terminal. Contrariamente a nuestro razonamiento, la ausencia de interacción de PKD1 autofosforilado con cualquiera de las dos construcciones de la nNOS, nNOS (1-102) o nNOS (1-131), muestra que la presencia de una carga negativa debida al grupo fosfato no confiere a PKD1 la capacidad de interaccionar con el dominio PDZ de nNOS. También se comprobó que construcciones más cortas de

PKD1 que contienen el motivo C-terminal silvestre (-VSIL) o un mutante fosfomimético (-VEIL) tampoco interaccionan con nNOS (Figura 24B).

Estos datos están en concordancia con los obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación y demuestran que el motivo de unión a PDZ de PKD1 no es el dominio crítico para la asociación de PKD1 con nNOS.



2. La asociación entre PKD1 activa y la nNOS aumenta debido a la localización subcelular conferida por su dominio de homología a pleckstrina.

A continuación se siguió estudiando la participación de otros dominios de PKD1 que pudieran mediar esta asociación, para lo que se transfectaron los dos mutantes de GFP-PKD1 a los que se había deletado o el dominio de homología a pleckstrina (PH) o el dominio rico en cisteínas (CRD), llamados PKD1^{ΔPH} y PKD1^{ΔCRD}, respectivamente. Antes de lisar las células, fueron tratadas o no con PDBu durante 15 min para activar PKD1. A continuación, los lisados fueron inmunoprecipitados con el

anticuerpo anti-myc, que permite inmunoprecipitar la nNOS y revelados con los anticuerpos anti-GFP, para detectar la presencia de los mutantes de GFP-PKD1 y anti-myc para comprobar que la nNOS había sido inmunoprecipitada correctamente. El mutante de PKD1 al que se le ha delecionado el dominio CRD todavía se asocia con la nNOS, aunque con menor afinidad que la proteína completa (Figura 25). Sin embargo, la delección del dominio PH impide la formación de los complejos nNOS/PKD1. Este resultado es particularmente importante ya que se sabe que el mutante PKD1^{ΔPH} es constitutivamente activo y autofosforila su extremo C-terminal en el motivo de unión a PDZ en la Ser916 (Iglesias y Rozengurt, 1998) y apoya los datos obtenidos hasta ahora en levaduras y células de mamífero, que indican que la fosforilación del motivo de unión a no está implicada en la asociación de nNOS/PKD1. En conjunto, a partir de estos experimentos se puede concluir que el dominio PH de PKD1, pero no su motivo de unión a dominios PDZ (fosforilado o no), es completamente necesario para la formación de complejos con nNOS. Se ha demostrado que el dominio PH media la interacción con la isoforma η de la PKC (Iglesias y Rozengurt, 1998). Los resultados obtenidos indican que la ausencia de interacción con la nNOS tras la delección del dominio PH de PKD1 puede deberse a un cambio en el plegamiento global de la proteína o en la orientación, a una deslocalización subcelular del mutante PKD1^{ΔPH} o bien a una interacción directa del dominio PH de PKD1 con nNOS.

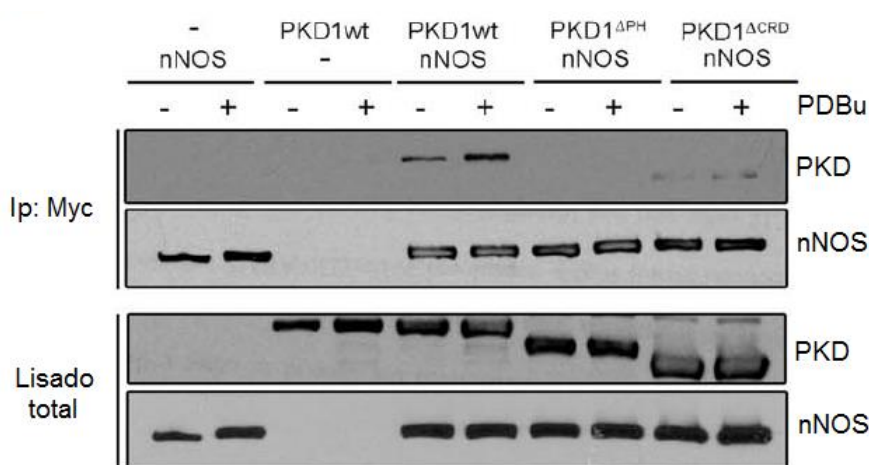
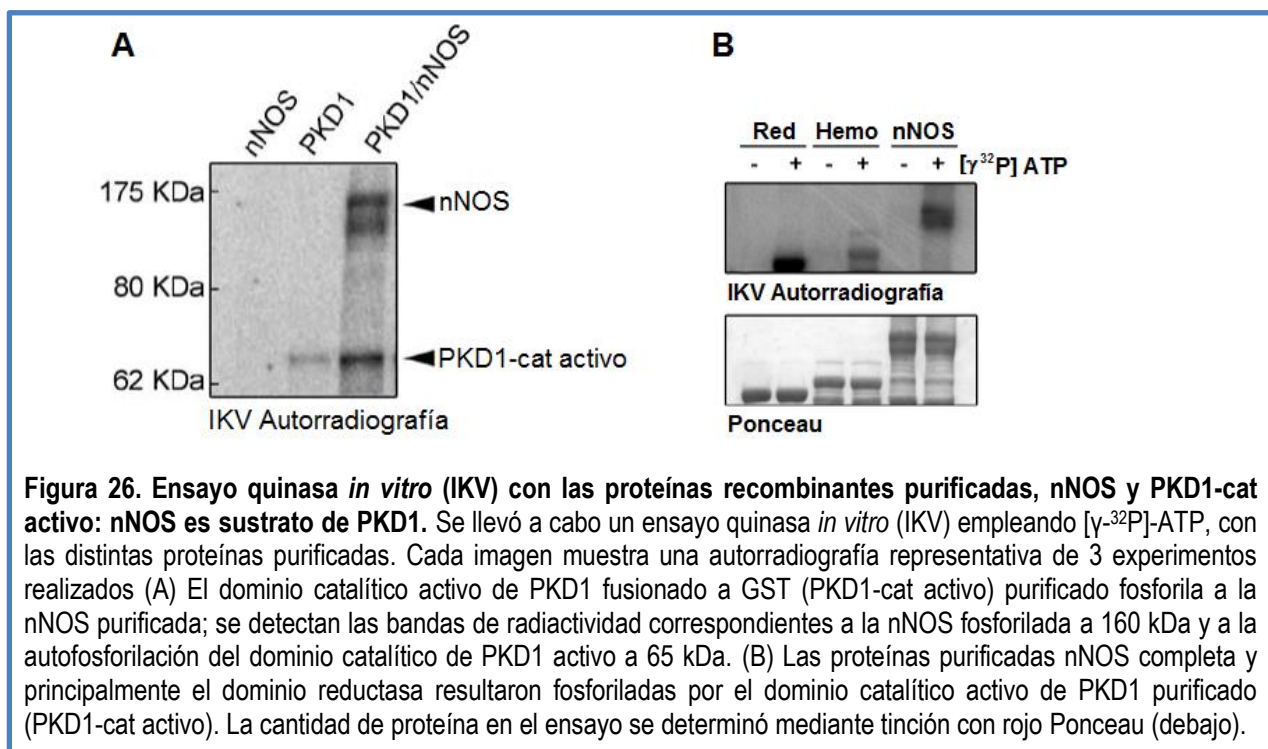


Figura 25. La asociación de PKD1 con nNOS se ve aumentada por el tratamiento con PDBu y por la presencia del dominio de homología a pleckstrina Células HEK293T se transfectaron con myc-nNOS (nNOS), junto con GFP-PKD1 (PKD1wt) o con mutantes a los que se delecionó el dominio PH (PKD1^{ΔPH}) o el dominio rico en cisteínas (PKD1^{ΔCRD}) y se trataron (+) o no (-) con PDBu 48 h después de la transfección. Los lisados totales se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-myc (Ip: myc). Los inmunocomplejos se separaron mediante PAGE-SDS y la presencia de PKD1 y nNOS se analizó mediante inmunodetección con los anticuerpos anti-GFP y anti-myc, respectivamente. Se muestran los niveles de expresión de nNOS, PKD1wt o de los diferentes mutantes presentes en el lisado total. El tratamiento con PDBu favorece la formación de los complejos nNOS/PKD1 y esta interacción requiere la presencia del dominio PH.

3. La nNOS es un nuevo sustrato de PKD1.

Teniendo en cuenta la asociación física entre PKD1 y nNOS, nos preguntamos si nNOS podría ser sustrato de PKD1. El análisis de la secuencia de la nNOS muestra que la mitad N-terminal, el dominio hemo-oxigenasa, presenta dos sitios consenso de fosforilación por PKD1 (IKRFGS³⁷⁴K y AWRNAS⁴¹³R). Por ese motivo, se investigó si la nNOS podía ser sustrato de PKD1, para lo que se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* empleando ATP radiactivo, [γ^{32} P]-ATP. Tal y como se muestra en la figura 26A, cuando la proteína nNOS completa purificada se incubó con el dominio catalítico activo de PKD1 fusionado a GST (PKD1-cat activo) purificado y los productos de la reacción se analizaron mediante autorradiografía, se podía ver una clara banda a 160 kDa, indicativa de la fosforilación de la nNOS. La autofosforilación del dominio catalítico de PKD1 activo también se podía detectar como una banda de radiactividad con una masa molecular aparente de 65 kDa. A continuación se incubó el dominio catalítico activo de PKD1 fusionado a GST (PKD1-cat activo) con el dominio N-terminal de la nNOS (hemo-oxigenasa), con el dominio C-terminal de la nNOS (reductasa) o con la nNOS completa. (Figura 26B). Contrariamente a lo esperado, la mayor parte del marcaje radiactivo se concentraba en el dominio reductasa, un resultado que contrasta con la predicción de los sitios de fosforilación putativos ya que ambos estaban presentes en el dominio hemo-oxigenasa, localizado en la mitad N-terminal de la nNOS.



Para identificar los residuos de la nNOS fosforilados por PKD1, el producto de un ensayo quinasa *in vitro* similar al anterior pero realizado con ATP no radiactivo, fue digerido con tripsina y sometido a HPLC y fragmentación de los péptidos mediante MALDI-TOF/TOF (Figura 27). Para nuestra sorpresa, de los muchos péptidos derivados de la nNOS que se obtuvieron, el único fosfopéptido significativo que fue identificado correspondía a LRSEIAFIEESKK (aminoácidos L1408-K1421 de la nNOS de rata- N° de

acceso P29476). La secuenciación *de novo* de un péptido triptico eluido con una masa de 1715,85 Da, mostró que correspondía a la secuencia LRSE(pS)IAFIEESKK y el residuo fosforilado se asignó, sin ninguna duda, al aminoácido Ser situado en la quinta posición (pS; b_5 in Figura 27). Este análisis nos permitió asignar con seguridad a la Ser1412 de la nNOS (Rata LRSE-pS¹⁴¹²-IAFIEESKK), como la serina fosforilada por PKD1 *in vitro*. En este contexto, se debe mencionar que, en concordancia con los datos cristalográficos existentes, esta Ser1412 se localiza dentro de la hélice α C-terminal de la nNOS y se sabe que su fosforilación induce un cambio conformacional que aumenta la transferencia de electrones derivados del NADPH, desde el dominio reductasa al dominio hemo oxigenasa (Garcin et al., 2004).

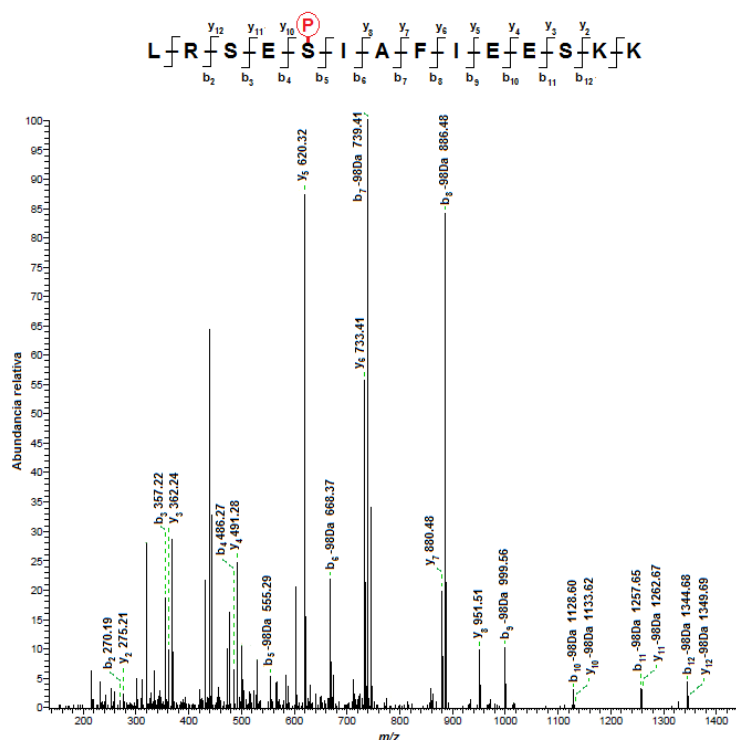


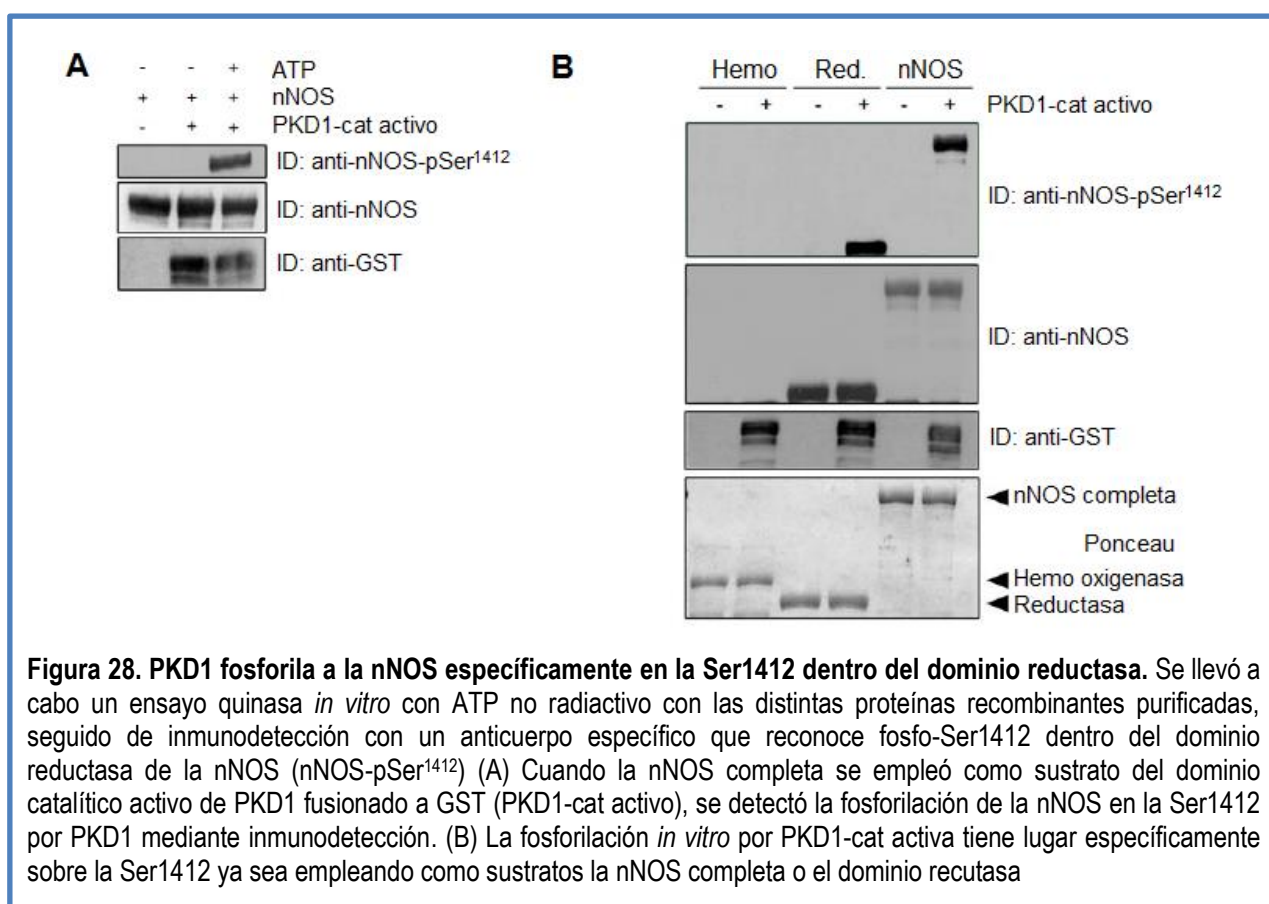
Figura 27. Identificación de la Ser1412 de la nNOS de rata como único sitio de fosforilación por PKD1 mediante espectrometría de masas. Se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* empleando ATP y Mg^{2+} , con la nNOS completa de rata recombinante purificada (1429 aminoácidos, N° de acceso P29476.) y el dominio catalítico activo de PKD1 fusionado a GST (PKD1-cat activo) purificado. Tras la reacción, la muestra se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron mediante HPLC acoplado a MALDI-TOF/TOF. Se muestra el espectro MS/MS del péptido triptico de la nNOS 1408LRSEpSIAFIEESKK1421 (Masa, 1715,851 Da) tras la fragmentación. En la parte superior se indican las series iónicas b (fragmentación N-terminal) e y (fragmentación C-terminal), que son detectadas prácticamente en su totalidad. La generación típica de dehidroalanina a partir de fosfoserina debido a la pérdida del fosfato durante el análisis, se observa como un desplazamiento de -98 Da en las series iónicas b e y. La fragmentación del precursor muestra de forma inequívoca que la Ser1412 es el sitio de fosforilación. No se detectaron otros fosfopéptidos entre los más de 200 péptidos resueltos mediante HPLC acoplado a MALDI-TOF/TOF.

Dado que este residuo de Ser fosforilado de la nNOS no había sido predicho que formara parte de una secuencia de fosforilación consenso de PKD1, comparamos la secuencia de aminoácidos de varios sustratos conocidos de PKD1 (Tabla 2) en los que típicamente aparece un residuo hidrofóbico como Leu o Ile en posición (-5), junto con un residuo básico como Lys o Arg en posición (-3). Al igual que en la

eNOS, el extremo C-terminal de la nNOS sólo cumple de forma parcial estos requerimientos ya que un residuo básico, Arg, está presente en posición (-5) en la nNOS. Sin embargo, el extremo C-terminal de ambas proteínas es sustrato de PKD1. En el caso del extremo C-terminal de la nNOS, PKD1 fosforila la Ser1412 tanto *in vitro* como *in vivo*, como se demostrará a continuación. Además, varios de los aminoácidos presentes en la secuencia de nNOS que es reconocida por PKD1 son idénticos a los que aparecen en otros sustratos conocidos de PKD. Además del residuo de Arg conservado en posición (-3), la secuencia de fosforilación de la nNOS muestra una Ser en posición (-2) (como en el caso de SSH1L (*Slingshot 1 like*) (Eiseler et al., 2009)), un Glu en posición (-1) (como en el caso de cortactina) y una Ile en posición (+1) (como en el caso de PKD1) (Tabla 2). Aunque las Ser375 y Ser413 cumplen los criterios de secuencia consenso de fosforilación por PKD, no se detectó que fueran fosforiladas por la quinasa.

4. En células vivas, la Ser1412 de la nNOS es fosforilada por PKD1.

Para confirmar que la Ser1412 de la nNOS era fosforilada por PKD1, se empleó un anticuerpo comercial específico que reconoce esta fosfo-posición en la nNOS (nNOS-pSer¹⁴¹²). Se realizó un ensayo quinasa *in vitro* como se ha descrito anteriormente, seguido de inmunodetección. El anticuerpo anti-nNOS-pSer¹⁴¹² sólo detectaba la nNOS purificada cuando había sido preincubada con el dominio catalítico activo de GST-PKD1 en presencia de ATP (Figura 28A). Además, se realizó el mismo ensayo empleando los dos dominios independientes para mostrar que PKD1 era capaz de fosforilar la Ser1412 en la proteína completa y en el dominio reductasa (Figura 28B).



Para validar los resultados obtenidos *in vitro* se comprobó si la nNOS era también sustrato de PKD1 *in vivo*, para lo que se cotransfectaron células HEK293T con la nNOS silvestre, que tiene el epítipo myc, (nNOS) o con el mutante no fosforilable nNOS-Ser1412Ala (nNOS^{SA}) junto con un mutante constitutivamente activo de PKD1 fusionado a GFP (GFP-PKD1ca). Los niveles de GFP-PKD1ca o de la myc-nNOS mutada o silvestre, expresados ectópicamente, fueron similares en todos los lisados celulares totales. En concordancia con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas, se detectó que tras la inmunoprecipitación de la nNOS con el anticuerpo anti-myc, la Ser1412 es fosforilada *in vivo* sólo en aquellas células que han sido cotransfectadas con PKD1 constitutivamente activa y con la nNOS silvestre, pero no se detectó señal en las células transfectadas con el mutante no fosforilable nNOS-Ser1412Ala (Figura 29).

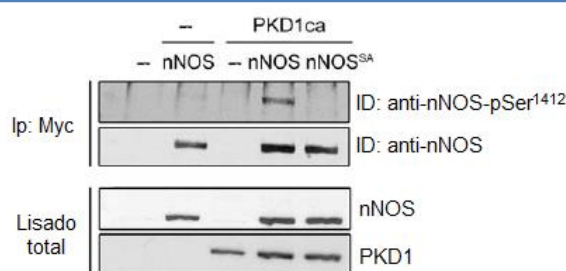


Figura 29. *In vivo*, PKD1 fosforila a la nNOS en la Ser1412. Células HEK293T se cotransfectaron con el vector pEFBOS-GFP (-) o con el mutante de PKD1 constitutivamente activo (PKD1ca) clonado en dicho vector y con myc-nNOS completa silvestre o su mutante no fosforilable myc-nNOS-Ser1412Ala (nNOS^{SA}). Dos días más tarde, las células se lisaron y los lisados totales se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-myc (Ip: myc). La detección en los inmunocomplejos de la nNOS fosforilada en la Ser1412 o de la nNOS total se determinó mediante inmunodetección empleando el anticuerpo fosfo-específico (nNOS-pSer¹⁴¹²) o un anticuerpo frente a nNOS total. Asimismo se muestran los niveles de las proteínas nNOS y GFP-PKD1ca en el lisado total. Este *blotting* es representativo de 3 experimentos independientes.

5. La fosforilación de la nNOS por PKD1, conlleva su activación

El conjunto de los datos obtenidos indican que la activación de PKD1 aumenta la formación del complejo con la nNOS y que, tanto *in vitro* como *in vivo*, PKD1 fosforila específicamente a la nNOS en la Ser1412. Estudios previos han demostrado que la actividad de la nNOS es regulada por la acción concertada de varias proteínas quinasas y fosfatasas (Garthwaite, 2008; Steinert et al., 2013; Zhou y Zhu, 2009). Como se ha comentado anteriormente, diversas vías de señalización conllevan la activación de proteínas quinasas celulares que convergen en esta posición localizada en la hélice α C-terminal de la nNOS. En este contexto, la activación de la nNOS tras la fosforilación de la Ser1412 se ha descrito para las proteínas quinasas Akt/PKB, PKA y AMPK (Chen et al., 2000; Fulton et al., 1999; Rameau et al., 2007; Yen et al., 2011). Así, el tratamiento con AMPA de cultivos de células de retina (Socodato et al., 2012) y la estimulación con glutamato de NMDAR en cultivos primarios de neuronas corticales (Rameau et al., 2007), conllevan la fosforilación de la Ser1412 de la nNOS y un consiguiente aumento de la síntesis de \bullet NO. Por ello, el siguiente objetivo fue demostrar que la PKD1 activa estimulaba la actividad enzimática de la nNOS induciendo así la producción de \bullet NO. Para ello, células COS-7 se trataron con

DAF2-DA, un agente que se emplea para detectar y cuantificar concentraciones bajas de $\bullet\text{NO}$. La transfección de las células COS-7 con la nNOS silvestre conllevó un aumento modesto en los niveles de fluorescencia, probablemente debido a la ausencia de la adición de ionóforos de calcio (Figura 30). En cambio, la cotransfección de PKD1, supuso un aumento significativo de la síntesis de $\bullet\text{NO}$, detectado por un aumento de la fluorescencia del DAF. Como control positivo, se transfectaron las células COS-7 con iNOS, la isoforma que une $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ de forma irreversible y que se sabe que libera grandes cantidades de $\bullet\text{NO}$, lo que resultó en niveles de fluorescencia de DAF todavía mayores. Estos resultados claramente muestran que la fosforilación de la nNOS en la Ser1412 por PKD1 activa de forma considerable la síntesis de $\bullet\text{NO}$ *in vivo*.

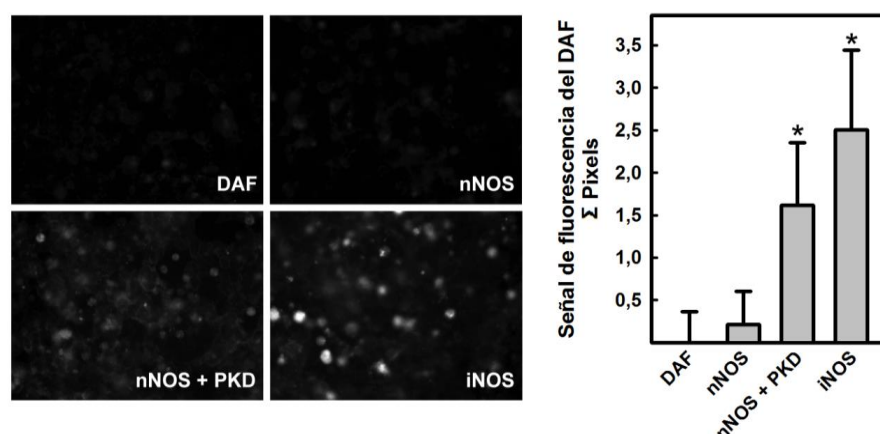


Figura 30. La fosforilación de la nNOS por PKD1 conlleva su activación y un consiguiente aumento de la síntesis de $\bullet\text{NO}$. Se transfectaron células COS-7 con la nNOS completa silvestre en ausencia o presencia de PKD1ca. Como control positivo, se transfectó un pocillo con la iNOS ya que produce grandes cantidades de $\bullet\text{NO}$, y como control negativo se transfectó otro pocillo con el plásmido pcDNA3 vacío (denominado DAF). Al día siguiente se cambió el medio a las células a su medio normal con extra L-Arg (5 mM) y BH_4 (15 μM). 48 h después de la transfección se lavaron las células con medio y se incubaron con la sonda fluorescente sensora de $\bullet\text{NO}$, DAF2-DA, a concentración 25 μM . El $\bullet\text{NO}$ producido por las células se dejó reaccionar con el DAF durante al menos 3 horas. A continuación, la monocapa se lavó exhaustivamente con medio y se detectó la fluorescencia entre 505 y 525 nm previa excitación a 488 nm. Se fotografiaron un mínimo de 4 campos amplios de la monocapa, de más de 400 células cada uno. Se muestra un campo representativo de cada una de las condiciones. La fluorescencia se cuantificó mediante la determinación de la intensidad de los píxeles y en cada caso se restó el valor de la fluorescencia correspondiente a las células trasfectadas con el plásmido vacío (DAF). Los datos corresponden a la media \pm S.D. para cuatro determinaciones. *, $p < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío (DAF).

Como prueba adicional de la síntesis de $\bullet\text{NO}$, se decidió determinar los niveles de la proteína VASP fosforilada en la Ser239 (VASP-pSer²³⁹), la cual se ha empleado como un marcador bioquímico de los niveles de $\bullet\text{NO}$ en células vivas (Sartoretto et al., 2009). Para determinar la influencia de la actividad de PKD1 en este parámetro, se cotransfectaron células HEK293T con nNOS y PKD1 constitutivamente activa (PKD1ca) (Figura 31). Las células se pretrataron o no con el inhibidor de la nNOS L-NAME (100 μM), durante 24 h. Como control positivo, se analizó la fosforilación de VASP en la Ser239 tras la incubación con un análogo de cGMP, el 8-Br-cGMP (100 μM) durante 30 min antes de proceder al lisado de las células. La inmunodetección y su cuantificación muestran que el $\bullet\text{NO}$ liberado por la nNOS

aumenta la señal de VASP-pSer²³⁹ tanto en la banda superior como en la inferior. Cuando la nNOS se sobreexpresó sola, la señal de VASP-pSer²³⁹ se vio claramente aumentada, mientras que PKD constitutivamente activa en solitario no tiene efecto en la fosforilación de VASP; en cambio, la coexpresión de PKD1ca junto con nNOS que implica la fosforilación de la Ser1412 activadora de la nNOS, elevó en gran medida la señal de fosforilación de VASP en la Ser239. (Figura 31, panel superior). Todos estos efectos se ven parcialmente revertidos en presencia de L-NAME.

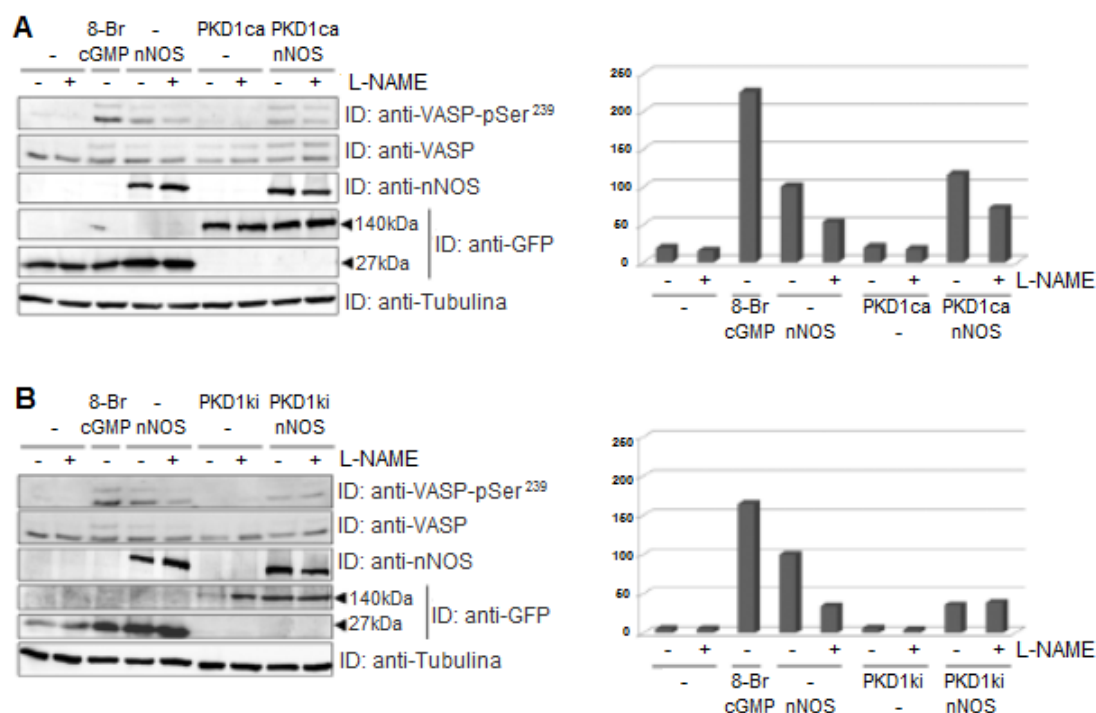


Fig 31. El aumento de los niveles de •NO tras la activación de nNOS por PKD1, conlleva la subsiguiente señalización vía cGMP/PKG y la fosforilación de VASP en la Ser239, un marcador bioquímico de los niveles de •NO en células vivas. (A) Se cotransfectaron células HEK293T con el vector pEFBOS-GFP vacío (-) o con la PKD1 constitutivamente activa (PKD1ca) clonada en dicho vector y con myc-nNOS. 24 h después de la transfección, se cambió el medio por medio fresco con extra L-Arg (5 mM) y BH₄ (15 µM) y las células se pretrataron (+) o no (-) con el inhibidor de la nNOS L-NAME (100 µM) durante las siguientes 24 h. Dos días después de la transfección, las células se lisaron y los lisados totales se analizaron mediante inmunodetección (ID). Como medida de la señalización activada por la producción de •NO, se empleó la detección de VASP fosforilada en la Ser239 (VASP-pSer²³⁹) que aparece como un doblete de 45 kDa y 50 kDa. Como control positivo, se logró una intensa señal de fosforilación de VASP-pSer²³⁹ mediante la incubación de un pocillo con el análogo de cGMP, el 8-Br-cGMP (100 µM) durante 30 min. Se muestran los niveles de expresión de VASP total, nNOS, GFP y GFP-PKD1ca, en los lisados totales. La señal de tubulina se empleó como control de carga. (B) Se realizó el mismo experimento y posterior análisis pero empleando el mutante de PKD1 quinasa inactivo (PKD1ki). Los gráficos de la derecha representan la cuantificación de las señales de inmunodetección correspondientes a las dos bandas de VASP-pSer²³⁹ (45kDa + 50kDa) normalizadas con respecto a los niveles de tubulina y expresadas de forma relativa a los valores obtenidos en células cotransfectadas con nNOS+GFP en ausencia de L-NAME (al que se asignó de forma arbitraria el valor de 100%). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. La cotransfección de la nNOS con PKD1ca aumenta los niveles de VASP-pSer²³⁹, mientras que el mutante inactivo impide esta fosforilación, lo que indica que la activación de la nNOS, la producción de •NO y la estimulación de la vía de señalización cGMP/PKG está bajo el control de la actividad de PKD.

Para complementar estos datos y validar que los cambios observados dependen de la actividad de PKD1 sobre la nNOS, se llevaron a cabo los mismos experimentos pero transfectando el mutante quinasa inactivo de GFP-PKD1 (PKDki) (Figura 31 panel inferior). Es importante resaltar que, cuando se expresó PKD1 inactiva, los niveles de VASP-pSer²³⁹ fueron casi indetectables y se redujeron de forma significativa en células que habían sido cotransfectadas, comparado con células que expresaban la nNOS sola. La disminución de la señal de las dos bandas de VASP-pSer²³⁹ incluso en ausencia de L-NAME demuestra que la estimulación de esta vía se ve obstaculizada cuando la actividad de PKD1 está comprometida. En resumen, estos resultados demuestran que existe una relación directa entre la actividad de PKD1, la activación de la nNOS y la producción de •NO.

BLOQUE 3: La interacción del extremo C-terminal de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) con proteínas PDZ regula su activación y la producción de •NO.

1. Clonación, expresión recombinante y purificación de mutantes delecionados en el extremo C-terminal de la iNOS.

Con el fin de estudiar el papel del extremo C-terminal de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la regulación de su actividad, se llevó a cabo la clonación y la expresión recombinante de distintos mutantes delecionados en el extremo C-terminal de la iNOS de macrófago de ratón, tanto de la proteína completa como del dominio reductasa (desde el aa 495, incluyendo así el dominio de unión a CaM). Se diseñaron tres mutantes $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 15$, que junto a la forma silvestre (wt) se clonaron en el vector de expresión pCWori, entre los sitios de restricción NdeI y XbaI (Figura 32). El mutante iNOS $\Delta 15$ completo no se logró obtener.

iNOS wt	AVFSYGAKKGSALleepKATRL – COOH
iNOS $\Delta 5$	AVFSYGAKKGSALeEL – COOH
iNOS $\Delta 10$	AVFSYGAKKG – COOH
iNOS $\Delta 15$	AVFSYV – COOH

Figura 32. Secuencia de aminoácidos de los mutantes delecionados en el extremo C-terminal de la iNOS. Se llevó a cabo la clonación y expresión recombinante de distintos mutantes delecionados en el extremo C-terminal tanto para la proteína completa como para el dominio reductasa de la iNOS. En gris se ha señalado el aminoácido que se ha cambiado al meter una diana de restricción XbaI con la secuencia de stop.

Las distintas proteínas fueron expresadas en la cepa BL21 y se co-expresaron junto a la calmodulina, necesaria para el correcto plegamiento de la iNOS. Se purificaron mediante dos cromatografías de afinidad: una resina de Ni-NTA, seguida de una columna de 2',5'-ADP-Sepharosa, obteniéndose una banda homogénea en torno a 65 kDa para los dominios reductasa y de 130 kDa para las proteínas completas, tal como se observa por PAGE-SDS (Figura 33).

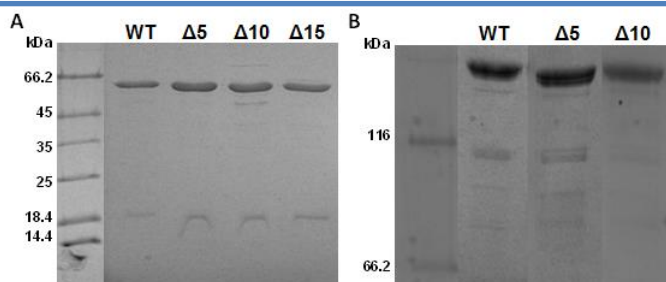


Figura 33. PAGE-SDS de las proteínas recombinantes de iNOS purificadas. Las distintas construcciones de la iNOS se expresaron de forma recombinante y se purificaron mediante dos resinas de afinidad. Se llevó a cabo un gel de PAGE-SDS con los dominios reductasa (A) y otro con las proteínas completas (B) y tras tinción de los mismos con azul de Coomassie se comprobó la elevada pureza de las proteínas. La banda inferior en torno a 18 kDa corresponde a la calmodulina.

2. Clonación, expresión recombinante y purificación de las proteínas con dominios PDZ: EBP50 y CAP70.

Se llevó a cabo la clonación, expresión recombinante en la cepa BL21 y purificación de dos proteínas con dominios PDZ. Por un lado se purificó el dominio PDZ1 de EBP50, con una extensión de seis histidinas en su extremo N-terminal, mediante una resina de Ni-NTA; la proteína completa CAP70 fusionada a lectina se purificó mediante la resina Sepharosa 4B (Figura 34).

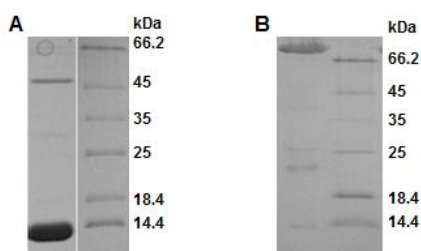


Figura 34. PAGE-SDS de las proteínas PDZ recombinantes purificadas. A) PAGE-SDS del dominio PDZ1 de EBP50: la banda de 12 kDa corresponde a la proteína purificada. B) PAGE-SDS de CAP70 completa fusionada a la lectina: la banda de 75 kDa corresponde a la proteína purificada. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

3. Medida de la actividad de iNOS, mediante el ensayo de reducción de citocromo c

3.1. La delección progresiva del extremo C-terminal aumenta la capacidad de reducción de citocromo c, tanto del dominio reductasa como de la proteína completa iNOS.

Para comprobar el efecto de la delección progresiva del extremo C-terminal en los dominios reductasa purificados, se valoró su actividad midiendo la capacidad de reducción de citocromo c. Se tomó como 100% el porcentaje de reducción obtenido para el dominio reductasa silvestre (wt) (Figura 35A). Del mismo modo se analizó la capacidad diferencial de reducción de citocromo c para las proteínas completas purificadas (Figura 35B). La delección de al menos 10 aa finales aumenta la capacidad de reducción de citocromo c tanto en para el dominio reductasa aislado como para la proteína completa.

3.2. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de reducción de citocromo c.

Para estudiar el efecto de la interacción con EBP50 y CAP70, se preincubó el dominio reductasa de la iNOS silvestre (wt) (16 nM) con cantidades crecientes de cada una las proteínas PDZ purificadas. Tras incubar ambas proteínas durante 4 h a 4°C se valoró la actividad de la iNOS mediante el ensayo de reducción de citocromo c (Figura 36). Cada pendiente se relativizó a la pendiente registrada en el ensayo empleando el dominio reductasa silvestre sin incubar con proteína PDZ. Tanto para EBP50 como para CAP70, a medida que aumenta la concentración de proteína PDZ, al menos hasta las concentraciones ensayadas, aumenta la capacidad de reducción de citocromo c por el dominio reductasa silvestre (wt).

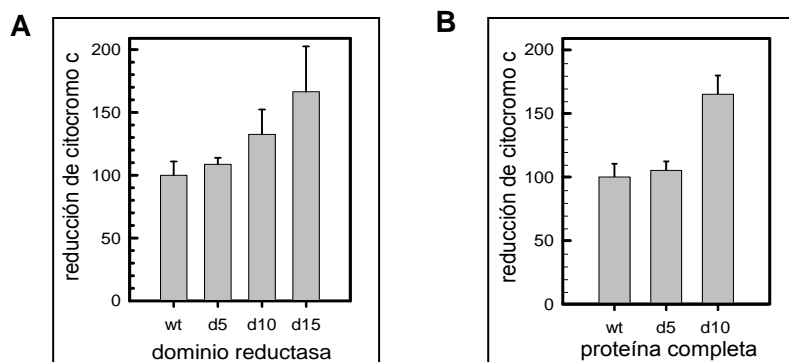


Figura 35. La delección progresiva del extremo C-terminal aumenta la capacidad de reducción de citocromo c, tanto del dominio reductasa como de la proteína completa iNOS. Valoración de la capacidad de reducción de citocromo c por (A) el dominio reductasa iNOS silvestre (wt) y sus mutantes delecionados en el extremo C-terminal $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 15$ y (B) por la proteína iNOS completa silvestre (wt) y por los mutantes de delección $\Delta 5$ y $\Delta 10$. La concentración de proteína recombinante en el ensayo fue de 16 nM para los dominios reductasa y 9.1 nM para las proteínas completas. Se valoró la capacidad de reducción de citocromo c tomando como 100% el porcentaje de reducción obtenido por el dominio reductasa silvestre (wt) o por la proteína completa silvestre (wt), respectivamente. La delección de al menos 10 aminoácidos finales tanto del dominio reductasa como de la proteína completa, aumenta la capacidad de reducción de citocromo c.

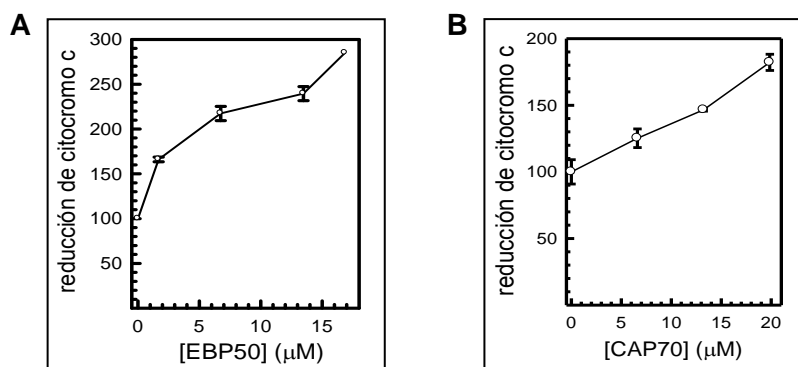


Figura 36. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de reducción de citocromo c. Valoración de la capacidad de reducción de citocromo c por el dominio reductasa silvestre de la iNOS (wt) (16 nM) tras la incubación con concentraciones crecientes de las proteínas purificadas, (A) PDZ 1 de EBP50 o (B) CAP70 completa. Cada punto se analizó por duplicado. A medida que aumenta la concentración de proteína PDZ, al menos hasta las concentraciones ensayadas, aumenta la capacidad de reducción de citocromo c por el dominio reductasa silvestre (wt).

4. Ensayo de reoxidación de flavinas.

4.1. La delección progresiva del extremo C-terminal del dominio reductasa silvestre de la iNOS aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas.

Para analizar como el extremo C-terminal de la iNOS afecta al proceso de formación de la semiquinona, se estudió la tasa de reoxidación de flavinas tanto para la proteína silvestre (wt) como para los mutantes delecionados $\Delta 10$ y $\Delta 15$ (no se estudió $\Delta 5$ porque su tasa de reducción de citocromo c era similar a la iNOS silvestre), empleando las construcciones correspondientes al dominio reductasa para evitar la contaminación en la señal por el dominio hemo. La reoxidación de las flavinas se monitorizó a

459 nm que corresponde a la longitud de onda del máximo de absorción del FAD (Figura 37). Al inicio del ensayo el FAD está oxidado y su absorbancia a 459 nm es máxima. Al añadir el NADPH, éste cede electrones al FAD y éste al FMN. Hasta que se cataliza la total oxidación del NADPH, las flavinas permanecen reducidas (el FAD está como FADH₂). Así, el cero en la absorbancia a 459 nm de la figura 37 representa las flavinas totalmente reducidas catalizando la oxidación del NADPH. Una vez agotados los electrones del NADPH, tiene lugar la reoxidación de las flavinas, lo que se manifiesta como un aumento en la absorbancia a 459 nm. El FAD puede bien volver a su estado oxidado, o bien quedar como semiquinona estable, con un electrón (FADH•) y esto es lo que ocurre para los mutantes analizados. En la figura 37, se puede ver que el NADPH es agotado más rápido a medida que aumenta la deleción en el extremo C-terminal ya que el *plateau* antes de que se forme la semiquinona es menor a medida que se trunca la proteína. Durante el tiempo ensayado la semiquinona permanece estable.

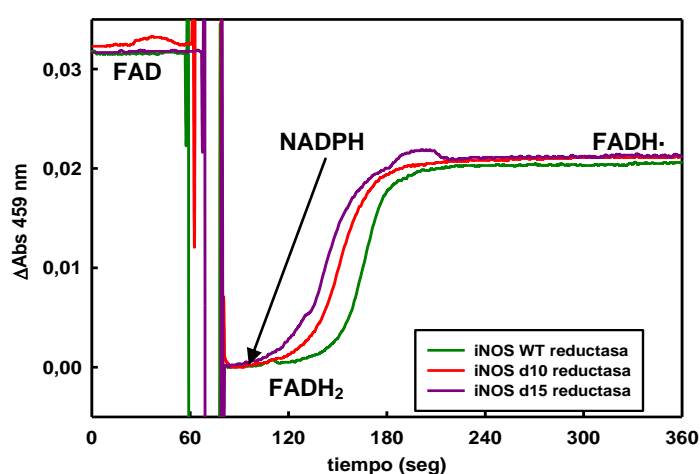


Figura 37. La deleción progresiva del extremo C-terminal del dominio reductasa silvestre de la iNOS aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas. Se valoró la tasa de reoxidación de flavinas del dominio reductasa silvestre (wt) (verde) y de los mutantes delecionados $\Delta 10$ (rojo) y $\Delta 15$ (morado), empleando en una concentración de iNOS 5 μM en tampón Tris 50 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM. Tras la adición de NADPH (concentración final 20 μM) se valoró a 459 nm la velocidad de reoxidación del FAD, pudiendo detectarse las formas oxidada inicial (FAD), reducida (FADH₂) tras la adición del donador de electrones y la forma semiquinona (FADH•).

Al mismo tiempo que se realizó cada ensayo se observó el cambio espectral (Figura 38) antes de añadir el NADPH (estado oxidado del FAD), nada más adicionarlo (FADH₂) y el estado final de semiquinona (FADH•). Estos cambios espectrales son similares tanto para la forma silvestre como para los mutantes de deleción (espectros no mostrados). Para ello se realizó un espectro antes de añadir el NADPH, donde la longitud de onda a 459 nm refleja el estado del FAD. Del mismo modo se realizó un espectro al final del ensayo. Pero para poder registrar el espectro en el estado reducido (FADH₂), fue preciso añadir una concentración mayor de NADPH (75 μM). Al ser así la concentración de NADPH mucho mayor, tarda más en consumirse y da tiempo a registrar el espectro donde la $\lambda 459 \text{ nm}$ refleja el FADH₂.

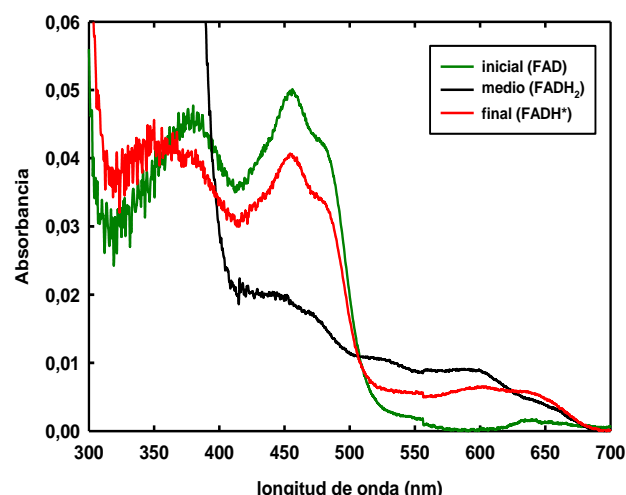


Figura 38. Reoxidación de flavinas por el dominio reductasa silvestre (wt) de la iNOS: cambios espectrales. Espectros correspondientes a los distintos estados del dominio reductasa silvestre (wt) de la iNOS (5 μ M) durante el ensayo de reoxidación de flavinas. El pico a 459 nm corresponde al FAD. En el estado inicial las flavinas están oxidadas (FAD) (línea verde); tras la adición del NADPH se reduce (FADH_2) (línea negra); al tiempo ensayado, en el estado final queda como semiquinona estable (FADH^\bullet) (línea roja).

4.2. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con la proteína PDZ EBP50, aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas.

Para analizar el efecto de las proteínas PDZ sobre el dominio reductasa silvestre (wt) de la iNOS, se incubó al menos 1 h a RT con el dominio PDZ1 de EBP50, lo que conlleva de nuevo un aumento en la velocidad de formación de la semiquinona (Figura 39).

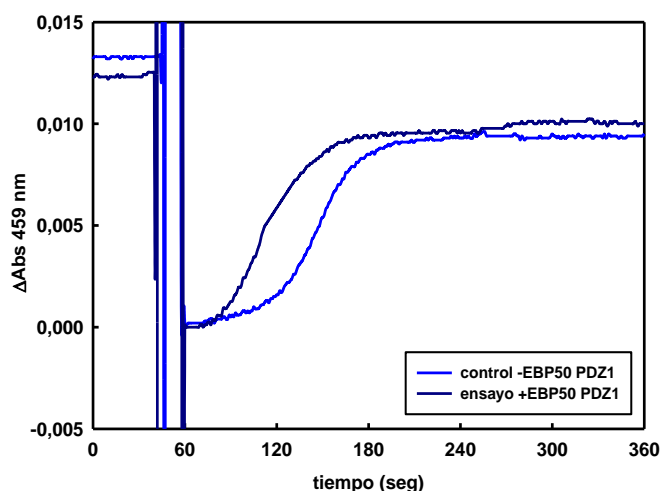


Figura 39. La interacción del dominio reductasa silvestre de la iNOS con la proteína PDZ EBP50, aumenta su velocidad de reoxidación de flavinas. Se valoró la tasa de reoxidación de flavinas dominio reductasa silvestre (wt) de la iNOS sin incubar con EBP50 (línea azul claro) y tras la incubación con EBP50 (azul oscuro), empleando una concentración de dominio reductasa silvestre 2.3 μ M y de EBP50 4.2 μ M en tampón Tris 50 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM. Tras la adición de NADPH (concentración final 10 μ M) se valoró a 459 nm la velocidad de reoxidación del FAD, pudiendo detectarse las formas oxidadas inicial (FAD), reducida (FADH_2) tras la adición del donador de electrones y la forma semiquinona (FADH^\bullet)

5. Medida de la actividad de la iNOS, mediante la determinación de la liberación de •NO.

5.1. La delección de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de la iNOS completa aumenta su capacidad de síntesis de •NO.

Dado que el extremo C-terminal de la iNOS modula la transferencia de electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio hemo-oxigenasa de la proteína (Roman et al., 2000b), analizamos el efecto de la delección del extremo C-terminal para la iNOS completa silvestre (wt) y para el mutante de delección $\Delta 10$ de la proteína completa. Se observa que la delección del extremo C-terminal conlleva un aumento en la capacidad de síntesis de •NO (Figura 40).

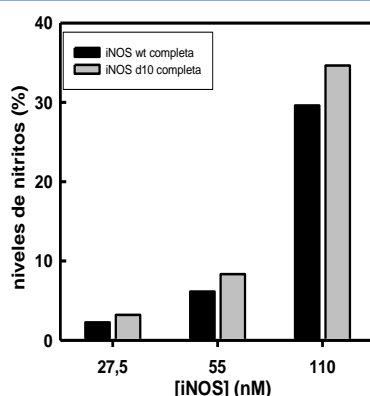


Figura 40. La delección de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de la iNOS completa aumenta su capacidad de síntesis de •NO. Empleando concentraciones crecientes de iNOS completa silvestre o del mutante de delección $\Delta 10$, se determinó su actividad valorando los niveles de •NO producidos, mediante el ensayo de Griess. La delección del extremo C-terminal conlleva un aumento en la capacidad de síntesis de •NO.

5.2. La interacción de la iNOS completa silvestre con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de síntesis de •NO.

A continuación se estudió el efecto de la unión del dominio PDZ1 de EBP50 o de la proteína CAP70 completa en la capacidad de síntesis de •NO por la iNOS completa silvestre (wt), mediante la valoración de nitritos por el ensayo de Griess. A las concentraciones ensayadas, la incubación de la iNOS completa silvestre (wt) con el dominio PDZ1 de EBP50 conlleva un aumento en la capacidad de síntesis de •NO del 26% y en el caso de CAP70 del 43% (Figura 41A). Asimismo, se llevó a cabo una titulación con concentraciones crecientes de CAP70 empleando una concentración de iNOS completa silvestre (wt) de 55 nM y del mismo modo se procedió a valorar los nitritos producidos mediante el ensayo de Griess (Figura 41B), observándose un aumento en los niveles de •NO producidos a medida que aumentó la concentración de CAP70.

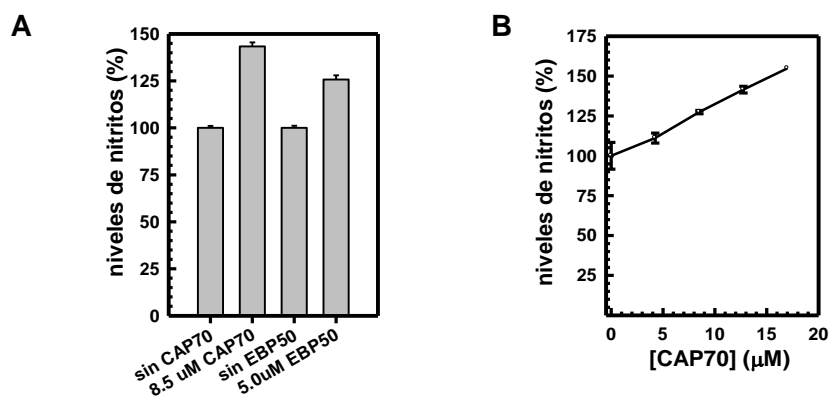


Figura 41. La interacción de la iNOS completa silvestre con las proteínas PDZ EBP50 y CAP70, aumenta su capacidad de síntesis de \bullet NO. (A) Se incubó la iNOS completa silvestre (wt) recombinante a una concentración de 27.5 nM, con un exceso molar del PDZ1 de EBP50 o con CAP70 y se valoró la capacidad de síntesis de \bullet NO. (B) Se incubó la iNOS completa silvestre (wt) (55 nM), con concentraciones crecientes de CAP70 y se valoró la capacidad de síntesis de \bullet NO. En ambos experimentos, la actividad se refirió a la registrada en ausencia de proteína PDZ, a la que se consideró como el 100% de actividad.



DISCUSIÓN

BLOQUE 1: La fosforilación de la Ser1179 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS) y la producción de •NO

Diferentes estímulos como VEGF (Fulton et al., 1999; Michell et al., 2001), bradiquinina (Fleming et al., 2001; Schneider et al., 2003) o fuerzas de rozamiento hemodinámicas (Dimmeler et al., 1999; Gallis et al., 1999) estimulan la fosforilación de la Ser1177 en la eNOS humana (1179 en la eNOS bovina) por diferentes quinasas que varían según el estímulo aplicado. Esta serina se encuentra en la hélice α C-terminal al final del dominio reductasa y su fosforilación, induce un cambio conformacional que estimula el flujo de electrones dentro del dominio reductasa, aumenta la sensibilidad al Ca^{2+} de la enzima y representa un mecanismo adicional e independiente de activación de la eNOS (Fleming y Busse, 2003; McCabe et al., 2000). Esta serina está inmersa en un secuencia consenso de fosforilación por Akt/PKB (RXRXX(pS/pT)X, que es RIRTQpSF en la eNOS y RLRSEpSI en la nNOS). La fosforilación en esta serina de la eNOS por Akt/PKB (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999) y AMPK (Chen et al., 1999) tanto *in vitro* como en un entorno celular ha sido ampliamente descrita. Además, al menos un total de seis quinasas (Akt/PKB, AMPK, PKA, cGK-I/PKG, Chk1 and CaMKII) convergen en la misma serina activadora y en todos los casos la fosforilación se correlaciona con activación y aumento de la síntesis de •NO (revisado por Dudzinski y Michel (Dudzinski y Michel, 2007)).

Las quinasas de la familia de PKD fosforilan preferentemente a sus sustratos en la secuencia consenso (L/I)X(R/K)XX(pS/pT) (Nishikawa et al., 1997). Existe un anticuerpo comercial que reconoce sustratos de PKD, concretamente el motivo LXRXX(pS/pT), que tal como indica su prospecto, puede dar reacción cruzada con péptidos y proteínas con Arg en posición (-3) y un aminoácido básico o hidrofóbico en posición (-5).

Hao y col. (Hao et al., 2009) emplearon este anticuerpo que reconoce sustratos de PKD en un lisado de células endoteliales HUVEC no estimuladas y tras la inmunodetección observaron al menos 9 bandas que eran por lo tanto sustratos de PKD fosforilados. Una de esas banda, con un tamaño de aproximadamente 130 kDa nos hizo sospechar que se tratara de la eNOS no sólo por el tamaño, sino porque su fosforilación se inducía por VEGF. La secuencia donde se fosforila la eNOS podría ser reconocida por el anticuerpo comercial frente a sustratos fosforilados por PKD ya que aunque preferentemente reconoce fosfo-sustratos de PKD con un motivo LXRXX(pS/pT), puede dar reacción cruzada con péptidos y proteínas fosforilados con Arg en posición (-3) y un aminoácido básico o hidrofóbico en posición (-5) y efectivamente la eNOS tiene un residuo básico (Arg) en ambas posiciones. La fosforilación de esta banda también aumentaba con PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato, un activador directo de la familia de PKD), aunque en menor medida que con VEGF y en células sin estimular disminuía al silenciar PKD2 y en células estimuladas con VEGF tanto al silenciar PKD1 como PKD2. Como en este mismo artículo se describía que PKD2 desempeña un papel esencial en la proliferación de células endoteliales y la migración necesaria para la angiogénesis, reforzó la sospecha de que dicha

banda fosforilada por PKD en células endoteliales fuera la eNOS de forma que PKD regulara la actividad de eNOS y la síntesis de •NO, de modo que la implicación de PKD en la proliferación de células endoteliales, migración y angiogénesis se llevara a cabo, al menos en parte, a través de la activación de su sustrato eNOS.

Los resultados obtenidos tanto *in vitro*, con las proteínas recombinantes, como *in vivo*, mediante la cotransfección de distintas construcciones, indican que la PKD fosforila a la eNOS bovina en la Ser1179 y que esta fosforilación es activadora. Así, si bien en ausencia de PKD existe una fosforilación basal de la eNOS silvestre en la Ser1179, debido a la existencia de numerosas quinasas que convergen en esa posición, la transfección con PKD1 o PKD2 silvestres aumenta la fosforilación en la Ser1179 (Figuras 16 y 18A). El aumento en la señal de fosforilación fue mayor cuando se cotransfectaron con PKD1 constitutivamente activa y disminuyó al transfectar la PKD1 inactiva (Figura 18B). La disminución de la señal al transfectar la construcción PKD1ki demuestra que la estimulación de esta vía se ve obstaculizada cuando la actividad de PKD1 está comprometida. La eNOS resultó fosforilada *in vivo* en la Ser1179 sólo en aquellas células que habían sido transfectadas con la eNOS silvestre, pero no se detectó señal en las células transfectadas con el mutante no fosforilable eNOS-Ser1179Ala.

A pesar del número creciente de sustratos de PKD identificados, se conoce muy poco acerca de su asociación con la quinasa. Para la mayoría de los sustratos de PKD, como Hsp27 (Doppler et al., 2005), troponina (Haworth et al., 2004), Snail (Du et al., 2010), SSH1L (Peterburs et al., 2009), RIN1 (Wang et al., 2002; Ziegler et al., 2011), CERT (*Ceramide transfer protein*) (Fugmann et al., 2007), *oxysterol binding protein* (Nhek et al., 2010) o esfingosina quinasa (Ding et al., 2007), no existen estudios de asociación. En el caso de rotequina (Pusapati et al., 2012) y PI4KIIIβ (Hausser et al., 2005) los estudios de asociación dieron resultados negativos. Pocos sustratos se ha visto que se asocian con PKD, como Kidins220 (Iglesias et al., 2000), HDAC5 (Vega et al., 2004), E-cadherina (Jaggi et al., 2005), β-catenin (Du et al., 2009), CREB (Johannessen et al., 2007) y cortactina (Eiseler et al., 2010).

Los resultados obtenidos muestran que, en células transfectadas, PKD1 y su sustrato eNOS pueden interaccionar de forma directa asociándose en un complejo, aunque no se ha observado que algún dominio concreto de PKD sea indispensable para esta asociación (Figura 21B), ni que se vea potenciada tras la activación de la quinasa (Figura 22). Mediante la transfección de distintas construcciones de la eNOS, eNOS completa, el mutante delecionado en el extremo C-terminal (eNOSΔ27), el dominio NADPH (aa 988-1205) o el dominio hemo-oxigenasa (HEMO, aa 1-521), seguido de la inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal anti-eNOS, observamos que la asociación no está ligada al proceso de fosforilación ya que el mutante de la eNOS delecionado en el extremo C-terminal que ha perdido el sitio de fosforilación sigue interaccionando con PKD, pero implica al dominio NADPH de la eNOS, pues con este fragmento sigue inmunoprecipitando PKD, pero no lo hace cuando se transfecta el dominio hemo (Figura 22).

Estos resultados de asociación de la quinasa y su sustrato, tienen precedentes ya que la isoforma endotelial eNOS puede ser co-inmunoprecipitada con diferentes proteínas quinasas que fosforilan la Ser equivalente en la hélice α activadora carboxi-terminal. Es el caso de Akt/PKB (Takahashi y Mendelsohn, 2003), AMPK (Morrow et al., 2003) y Chk1 (Park et al., 2011) que fosforilan y pueden ser co-inmunoprecipitadas con eNOS tras la activación de la quinasa.

Aunque PKD normalmente reconoce un motivo consenso que presenta un residuo hidrofóbico como Leu/Val/Ile en posición (-5) y Arg/Lys en posición (-3) respecto del residuo de serina fosforilable (Nishikawa et al., 1997; Rozengurt, 2011) y la eNOS muestra residuos de Arg en ambas posiciones (RIRTQpS¹¹⁷⁹), los resultados obtenidos indican que PKD media la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 y el consiguiente aumento de la actividad enzimática. Se trata de un sitio atípico de fosforilación de PKD (Tabla 2). Como se ha comentado, la fosforilación en la Ser1179 es activadora y estudios previos llevados a cabo con la eNOS recombinante purificada en los que se ha mimetizado la fosforilación de esta serina mediante la sustitución por un residuo ácido, aumenta directamente la actividad de la enzima y altera la sensibilidad de la enzima por Ca^{2+} , haciendo su actividad máxima a concentraciones de este catión por debajo de las fisiológicas (McCabe et al., 2000).

La angiogénesis, la formación de nuevos capilares sanguíneos, es un componente muy importante del desarrollo vascular embrionario, reparación de herida (*wound healing*) y regeneración de órganos, así como en procesos patológicos como retinopatías diabéticas, aterosclerosis y crecimiento tumoral (Carmeliet, 2003; Ferrara et al., 2003; Folkman, 1995). El proceso de angiogénesis depende de la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales. El VEGF es esencial para muchos procesos angiogénicos tanto en condiciones normales como patológicas (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995). Los receptores de VEGF, VEGFR1 (Flt1) y VEGFR2 (también llamado Flk1 en ratón o KDR en humano) principalmente se encuentran en células endoteliales (Yancopoulos et al., 2000). La unión de VEGF a sus receptores induce la dimerización y subsiguiente fosforilación de los mismos, lo que conduce a la activación de diversas moléculas de señalización intracelular como fosfatidilinositol 3-quinasa, PLC γ , PKC, Akt, ERK, NOS, MAPKs y quinasas de adhesión focal (Takahashi et al., 2001; Zachary, 2003). Ya ha sido descrito que la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 en células BAEC se estimula con el tratamiento con VEGF o IGF-1 y que Akt se activa en paralelo (Michell et al., 1999).

Por otro lado, PKD está implicada en numerosas rutas de transducción de señales y en proliferación celular. Wong y col. (Wong y Jin, 2005) demostraron que PKD también media la señalización y función del VEGF en células endoteliales y que el VEGF estimula rápida y fuertemente la fosforilación y activación de PKD en células endoteliales vía VEGFR2. Sus resultados demostraron que VEGF activa PKD vía la ruta VEGFR2/PLC γ /PKC α y revelaron un papel clave desempeñado por PKD en la señalización de ERK y en la proliferación de las células endoteliales inducidas por VEGF.

Hemos comprobado que en células endoteliales BAEC, estímulos celulares como el VEGF, o un estímulo artificial como es el éster de forbol PDBu que es un activador de PKD, inducen la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 mediado, no sólo por otras quinasas, sino también por PKD (Figura 17) y hemos estudiado el cambio en la localización subcelular tanto de PKD1 o PKD2 como de eNOS, tras dicha estimulación (Figura 20).

Para estudiar el papel fisiológico que implica la fosforilación y activación de la eNOS por PKD, llevamos a cabo ensayos de reparación de herida (*wound healing*), para así determinar el papel de PKD en la migración de las células endoteliales, una etapa importante en el proceso de angiogénesis. El grupo de Hao y col. (Hao et al., 2009) previamente había determinado que el silenciamiento de PKD2 en células HUVEC inhibía la proliferación, la migración y la angiogénesis *in vitro*.

Comprobamos que la migración de las células endoteliales BAEC inducida por VEGF o PDBu se veía disminuida en gran medida tras el tratamiento con un inhibidor de la eNOS, el L-NAME, por lo que efecto en la migración viene mediado por el •NO (Figura 23A). Cuando las células BAEC se pretrataron con el inhibidor de PKD Gö6976 o un inhibidor de PKD específico (Figura 23B), se observó que la capacidad de migración inducida por PDBu se veía disminuida, de forma más acusada que tras el tratamiento con inhibidores de la quinasa Akt. Estos resultados demuestran que la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 por PKD, tiene un efecto activador y el aumento de los niveles de •NO potencia la capacidad de migración de las células endoteliales, etapa clave para el proceso de angiogénesis. Esta capacidad de migración se ve atenuada no sólo al inhibir a la eNOS con el inhibidor L-NAME, sino en una etapa previa, bloqueando su activación al inhibir la PKD, que ya no la puede fosforilar en la Ser1179 activadora.

Hay dos hechos más que relacionan la cascada de señalización de VEGF/PKD/eNOS. Como se ha comentado las histonas deactilasas de clase II (HDACs 4, 5, 7 y 9) regulan la estructura de la cromatina mediante la interacción con diversos factores de transcripción para reprimir su actividad. PKD fosforila residuos específicos en las HDACs de clase II, lo que conduce a su asociación con proteínas 14-3-3 en células endoteliales y otros tipos celulares con el consiguiente secuestro de HDACs en el citoplasma y la liberación de genes diana en el núcleo de la acción represiva de HDAC, con lo que se facilita la expresión de los mismos. Por ejemplo, HDAC7 se ha implicado en la regulación de la morfología de las células endoteliales, migración y capacidad para formar estructuras similares a capilares *in vitro* (Mottet et al., 2007) y su salida del núcleo es inducida por VEGF a través de la fosforilación de las serinas mediada por PKD de forma que, HDAC7 es secuestrada por 14-3-3 y exportada del núcleo con lo que se activa la expresión de los genes inducidos por VEGF en las células endoteliales (Ha et al., 2008a; Mottet et al., 2007; Wang et al., 2008). El VEGF, de forma dependiente de PKD, también estimula la fosforilación de HDAC5 en las Ser259 y 498, lo que conduce a la exclusión nuclear de HDAC5 y la consiguiente activación transcripcional (Ha et al., 2008b; Urbich et al., 2009). Así pues, el complejo programa de expresión génica

y migración desencadenado por VEGF en células endoteliales que conduce a angiogénesis es orquestado, al menos en parte, por la fosforilación de HDAC5 y HDAC7 mediada por PKD, que conduce a su exclusión del núcleo en estas células, convirtiendo a PKD en una atractiva diana para terapia antiangiogénica.

Pero además, en un artículo publicado en 1998 (Li et al., 1998) se describía que la activación de PKC α y PKC ϵ mediante el tratamiento con PMA o PDBu estimulaba la expresión de la eNOS en células endoteliales EA.hy 926, una línea celular derivada de células HUVEC y este aumento de los niveles de mRNA de eNOS era dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento con los ésteres de forbol, alcanzándose un máximo en los niveles de expresión del mRNA de eNOS a las 18 h y los niveles de proteína eNOS y su actividad aumentaban de forma similar. El aumento de los niveles de mRNA de eNOS era resultado de una aumentada transcripción del gen y no implicaba cambios en la estabilidad del mRNA. Además el tratamiento con el inhibidor Gö6976 impidió el aumento de los niveles de mRNA de eNOS inducido por PMA. Si bien no se hacía alusión, ambas isoformas de PKC activan a PKD.

Si tenemos en cuenta que el proceso de angiogénesis depende de la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales, que la PKD se ha implicado en la regulación de numerosos procesos celulares entre ellos transducción de señales, supervivencia celular, migración, diferenciación y proliferación celular, que PKD también media la señalización y función del VEGF en células endoteliales ya que el VEGF estimula rápida y fuertemente la fosforilación y activación de PKD (Wong y Jin, 2005), que PKD2 juega un papel importante en la proliferación de las células endoteliales y en la migración necesaria para la angiogénesis al menos en parte a través de la modulación de la expresión de VEGFR2 y FGFR1, dos receptores de factores de crecimiento claves implicados en angiogénesis (Hao et al., 2009) y que el •NO producido por la eNOS desempeña un papel clave en la angiogénesis post-natal, es fundamental para el desarrollo de la vasculatura de los pulmones en el feto y la morfogénesis del pulmón en ratones (Han y Stewart, 2006), es importante para la formación colateral y la angiogénesis post-isquemia (Murohara et al., 1998) y en definitiva los efectos positivos del •NO en la supervivencia de las células endoteliales es probable que contribuyan a los efectos pro-angiogénicos del •NO (Dimmeler y Zeiher, 1999), se puede concluir que la activación de la eNOS por PKD en células endoteliales es clave para la proliferación de las células endoteliales y migración necesarias en el proceso de angiogénesis.

BLOQUE 2: La fosforilación de la Ser1412 por la proteína quinasa D (PKD) regula la activación de la Óxido Nítrico Sintasa Neuronal (nNOS) y la producción de •NO.

De las tres isoformas de óxido nítrico sintasas, la isoforma neuronal nNOS es la única que posee un dominio PDZ en su extremo N-terminal. Los dominios PDZ interaccionan de forma selectiva con sus ligandos PDZ concretos. En particular, el dominio PDZ de la nNOS se ha determinado que muestra preferencia por motivos de unión a PDZ que cuentan con un residuo ácido en las posiciones (-2) o (-3) (Jaffrey et al., 1998; Schepens et al., 1997; Stricker et al., 1997; Tochio et al., 1999). El descubrimiento de que el extremo C-terminal de PKD1 era un motivo de unión a dominios PDZ que podía resultar autofosforilado en la posición (-2), la Ser916 y de esa forma presentar un residuo fosforilado negativamente cargado (Sanchez-Ruiloba et al., 2006), nos llevó a lanzar la hipótesis de que este motivo podría estar interaccionando directamente con el dominio PDZ de la nNOS. Los resultados obtenidos muestran que PKD1 y nNOS se asocian en un complejo cuya formación es potenciada tras la activación de la quinasa. En contra de la hipótesis de partida, los experimentos realizados en levaduras y células de mamífero muestran que la asociación de estas dos enzimas tiene lugar independientemente del dominio de unión a PDZ de PKD1 y del estado de fosforilación de la Ser916 dentro de este motivo (Figura 24). En cambio, el dominio PH de PKD1 es necesario para su asociación con nNOS. El dominio PH de PKD1 es autoinhibitorio y mutaciones puntuales o su completa delección hacen que la quinasa sea constitutivamente activa (Iglesias y Rozengurt, 1998). A pesar de su estado activo y la consiguiente autofosforilación en la Ser916 dentro del motivo de unión a dominios PDZ, el mutante de PKD1 al que se delecionó el dominio PH (PKD1^{ΔPH}) es incapaz de interaccionar con nNOS (Figura 25). Es importante resaltar que, α -sintrofina, cuya interacción con nNOS a través de su dominio PDZ fue primeramente identificada (Brenman et al., 1996a), cuenta con un dominio PH necesario para dirigir a nNOS al sarcolema *in vivo*, además de su dominio PDZ (Adams et al., 2010; Adams et al., 2001); así, tanto el dominio PH como el dominio PDZ de α -sintrofina funcionan en concierto para facilitar la localización de nNOS. Estas observaciones apuntan a que podría existir un mecanismo molecular común por el que los dominios PH desempeñen un papel importante en la regulación de las asociaciones de nNOS con complejos proteicos y/o compartimentos/localizaciones subcelulares. El dominio PH de PKD1 inicialmente se vio que mediaba interacciones directas preferentemente con las nuevas isoformas de PKC, PKC η y PKC ϵ (Waldron et al., 1999b). Los resultados que obtuvieron indicaban que el dominio PH de PKD puede discriminar entre estructuras estrechamente relacionadas de una misma familia de enzimas, PKC η y PKC ϵ , revelando así un grado de especificidad entre interacciones proteína-proteína mediadas por dominios PH no detectado con anterioridad.

Estas PKCs participan en la vía clásica de activación de PKD1 (inducida por ésteres de forbol o la producción de DAG tras la activación de un receptor de membrana) a través de la fosforilación de las

Ser744 y 748 del lazo de activación (Iglesias et al., 1998b), que en definitiva conlleva la liberación de la autoinhibición ejercida por el dominio PH (Waldron y Rozengurt, 2003). PKC δ , otro miembro de la subfamilia de PKC nueva, participa en la activación de PKD inducida por estrés oxidativo a través de mecanismos que implican una activación inicial de las tirosinas quinasas Abl y Src (Doppler y Storz, 2007; Storz et al., 2003). En esta vía alternativa, la activación de Abl mediada por Src conlleva la fosforilación por Abl de la Tyr463 dentro del dominio PH autoinhibitorio de PKD1 y provoca un cambio conformacional que permite la fosforilación de la Tyr95 mediada por Src que genera un motivo de unión para PKC δ , la formación de un complejo con PKC δ (que también se ha activado vía Src-Abl (Sun et al., 2000)) facilitando la fosforilación del lazo de activación y la consiguiente activación de PKD1 (Doppler y Storz, 2007; Storz et al., 2003). Independientemente de la vía implicada, un cambio conformacional y la liberación de la inhibición ejercida por el dominio PH, acompañan a la activación de PKD. Esta nueva conformación abierta puede presentar un dominio PH más accesible y favorecer la interacción o asociación de PKD activa con diferentes complejos proteicos, como parece que ocurre con nNOS. De forma similar a la nNOS, la actividad quinasa y el dominio PH de PKD son críticos para la interacción y activación de ASK1 (*Apoptosis signal regulating kinase 1*) (Zhang et al., 2005). Sin embargo, nuestros resultados muestran que PKD directamente fosforila y activa a nNOS mientras que no existen pruebas de que ASK1 sea sustrato de PKD o de que la actividad de ASK1 se estimule por la fosforilación directa de PKD, como vemos que ocurre con la nNOS.

El efecto de la activación de PKD en la asociación del sustrato sólo se ha estudiado anteriormente para Kidins220 (Iglesias et al., 2000) y HDAC5 (Vega et al., 2004) que forman complejos con la quinasa independientemente de su estado de activación. Así pues, nNOS es el primer sustrato identificado cuya asociación con PKD se ve claramente aumentada tras la activación de la quinasa. Además, los resultados obtenidos demuestran que PKD1 activa fosforila a la nNOS en la Ser1412 activadora tanto *in vitro* como *in vivo* (Figuras 26-29) estimulando de esta forma la actividad enzimática de la nNOS y aumentando la producción de •NO (Figuras 30, 31).

En las neuronas de mamíferos, la densidad postsináptica contiene los receptores de glutamato, que son activados por el neurotransmisor glutamato liberado desde la terminal presináptica, así como multitud de moléculas de señalización y estructurales asociadas. Se sabe que la densidad postsináptica está enriquecida en cientos de proteínas diferentes y, de hecho, la masa molecular media de la densidad postsináptica se ha estimado que es de ~1 gigadalton, lo que correspondería a ~10,000 copias de una proteína de 100 kDa (Chen et al., 2005). Así pues, *in vivo*, la proximidad de PKD1 y nNOS en las densidades postsinápticas, muy probablemente mediada a través de otras proteínas con dominios PDZ como PSD-95, conllevaría la fosforilación de nNOS. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que en células transfectadas, la quinasa activada y su sustrato pueden interaccionar también de forma directa, que como ya se comentó anteriormente, tiene precedentes ya que la isoforma endotelial eNOS puede ser co-

inmunoprecipitada con diferentes proteínas quinasas, Akt/PKB (Takahashi y Mendelsohn, 2003), AMPK (Morrow et al., 2003) y Chk1 (Park et al., 2011), que fosforilan la Ser equivalente en la hélice α activadora carboxilo-terminal y pueden ser co-inmunoprecipitadas con eNOS tras la activación de la quinasa.

Así pues se ha descrito la fosforilación de la nNOS en la Ser1412 y el consiguiente aumento de la actividad enzimática mediado por la actividad de PKD1. En este contexto, debe mencionarse que se trata de un sitio atípico de fosforilación de PKD (Tabla 2). Esta quinasa normalmente reconoce un motivo consenso que presenta un residuo hidrofóbico como Leu/Val/Ile en posición (-5) y Arg/Lys en posición (-3) respecto del residuo de serina fosforilable (Nishikawa et al., 1997; Rozengurt, 2011). La nNOS muestra residuos de Arg en ambas posiciones (RLRSES¹⁴¹²). A pesar de este hecho, nuestros resultados indican que la hélice α C-terminal de nNOS es accesible a la acción de la quinasa y muestran que PKD1 es un activador de esta isoforma. Dado que la serina equivalente de eNOS está sujeta a mecanismos similares de activación por fosforilación sería factible que PKD fuera un regulador general de la actividad enzimática de las isoformas constitutivas de NOS y de la síntesis de \bullet NO.

Así pues, estos descubrimientos abren nuevas perspectivas en la regulación de las óxido nítrico sintasas y en la producción de \bullet NO por PKD. Además, estos nuevos descubrimientos suman a la lista de las papeles biológicamente relevantes desempeñados por PKD, una función crucial como es la regulación de la síntesis de \bullet NO y con ello una multitud de procesos fisiológicos y patológicos en los que este mediador está implicado.

BLOQUE 3: La interacción del extremo C-terminal de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) con proteínas PDZ regula su activación y la producción de •NO.

Como se ha comentado anteriormente, a diferencia de la ferredoxina NADP⁺ reductasa y la citocromo P450 reductasa y pese a su gran homología de secuencia, las tres óxido nítrico sintasas de mamíferos poseen extensiones C-terminales ausentes en las dos primeras, que en el caso de la iNOS consta de 21 aminoácidos, que están implicadas en la modulación de la transferencia de electrones hacia el dominio oxigenasa. Ello indicaría que estas extensiones C-terminales controlan, en definitiva, la actividad reductasa del segundo dominio. Por otro lado, en general, si el sistema se encuentra acoplado (en presencia de L-arg y BH₄) un incremento en la capacidad reductasa del segundo dominio de las NOSs conduce a un aumento en la síntesis de óxido nítrico.

En el caso de la eNOS y de la nNOS, su extremo C-terminal posee un residuo de serina susceptible de ser fosforilado por parte de distintas quinasas, lo cual conduce a su activación y al aumento en la síntesis de •NO. Cuando se sustituye la serina fosforilable por un residuo de ácido aspártico, mimetizando así el grupo fosfato, la actividad reductasa y la actividad •NO sintasa aumentan considerablemente. Asimismo, la delección carboxi-terminal de 25 aa también conduce a un aumento de la actividad •NO sintasa y citocromo c reductasa por parte de la eNOS. Se asume que el extremo C-terminal de la eNOS y de la nNOS sería una “tapadera” que ejerce una acción modulable auto-inhibitoria que se pierde vía fosforilación o delección, en un proceso que conlleva un aumento en la transferencia de electrones y en la síntesis de •NO y/o un aumento en la sensibilidad de la enzima por Ca²⁺/CaM.

En el caso de la iNOS los datos relativos a la fosforilación de la enzima en esta región son inexistentes y lo que es más, estudios de delección han mostrado que esta región está también limitando la transferencia de electrones y por esta razón regulando la actividad de liberación de •NO por la iNOS. Como se ha comentado la clonación de la iNOS a partir de macrófagos murinos Raw 264.7 dio lugar a dos tipos de cDNA: uno más largo que daba lugar a una isoforma de 1144 aminoácidos, cuya secuencia coincidía con la de la proteína purificada y otro con una secuencia codificante más corta de 1122 aminoácidos, en la que los últimos 10 aminoácidos C-terminales diferían completamente de los de la isoforma larga que carecía de actividad NOS (Xie et al., 1992).

Hasta hace poco, la única proteína con dominios PDZ que se conocía que interaccionaba con el extremo C-terminal de la iNOS hepática (que posee un motivo de unión a PDZ de clase I) era EBP50 (Glynne et al., 2002) a través de su dominio PDZ1, el cual se une preferentemente al motivo -D(S/T)XL; estudios posteriores han demostrado que el dominio PDZ1 de EBP50 también interacciona con fuerza con el motivo consenso -(S/T)(R/Y)L. Por otro lado, en nuestro grupo se determinó que una proteína denominada CAP70 (NHERF-3), que consta de cuatro dominios PDZ en tándem, también se asocia a la iNOS a través de sus dominios PDZ que se unen al motivo consenso tipo I presente en su extremo C-

terminal. La unión de la iNOS a CAP70 trae consigo la translocación al dominio apical de la célula (Navarro-Lerida et al., 2007).

El papel del módulo carboxi-terminal ha sido estudiado anteriormente. Así, se clonaron varios mutantes de la isoforma larga, algunos puntuales y otros en los que se delecionó la extensión C-terminal, que en el caso de la iNOS cuenta con 21 aminoácidos. Por sí misma la delección progresiva de 22 (un aminoácido más de lo que supone la cola C-terminal), 23, 24 y 25 aminoácidos de la isoforma larga, redujo la tasa de síntesis de •NO en un 26%, 71%, 95%, 100%. La mutación de la Phe1122, el único residuo aromático dentro de una de las regiones más largas conservadas por todas las NOSs de secuencia conocida, supuso una reducción de la actividad enzimática del 41%. Esta era la primera demostración de que el extremo C-terminal de la iNOS era una región funcional crítica (Xie et al., 1994). Posteriormente, Roman y colaboradores (Roman et al., 2000b) estudiaron de nuevo el papel funcional de la “cola” C-terminal de la iNOS, para lo que deleccionaron exactamente los 21 residuos tanto de la iNOS murina completa como del dominio reductasa y compararon los resultados obtenidos con los de ambas construcciones sin deleccionar. En este caso observaron que tanto la proteína completa como el dominio reductasa truncados mostraban una capacidad de reducción de citocromo c que era de 7 a 10 veces mayor que la de las formas no truncadas. Además la forma completa deleccionada catalizaba la síntesis de •NO un 20% más rápido que la proteína completa no truncada.

Todos estos experimentos parecen indicar que los incrementos en las tasas de transferencia de electrones (actividad reductasa) no se traducen a los mismos niveles en términos de producción de •NO. Alternativamente, las delecciones realizadas podrían ser demasiado drásticas y las proteínas resultantes podrían ser inestables. Se debe tener en cuenta en este contexto, que la tasa de transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio hemo, determina las tasas de *turnover* de producción de •NO en las distintas NOSs (Nishida y de Montellano, 2001) y las delecciones en el dominio reductasa podrían conferir la capacidad de regular la transferencia de electrones a través de este dominio.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la delección progresiva del extremo C-terminal, para lo que se han clonado y purificado tres mutantes: $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 15$, tanto para el dominio reductasa de la iNOS como para la proteína completa y se ha comparado su actividad con las formas silvestres.

Dado que la reducción del citocromo c es un proceso determinado por la transferencia de electrones desde el módulo FMN de la reductasa hasta este aceptor de electrones (Vermilion et al., 1981), su tasa puede dar información considerando la actividad del dominio reductasa completo como un todo. La determinación de la actividad mediante la medida de reducción de citocromo c, permitió determinar para los dominios reductasa aislados que, si bien la delección de los 5 aa finales no tiene apenas efecto, la delección de 10 y más aún de los 15 aa finales supone un incremento de la capacidad de reducción de citocromo c, de un 32% y un 67% respectivamente. En el caso de las proteínas completas, la delección

de 5 aa tampoco tuvo efecto, pero la delección de 10 aminoácidos supuso un aumento de un 65% (Figura 35).

El extremo C-terminal de la iNOS presenta un motivo de unión a dominios PDZ y a través del mismo interacciona con EBP50 y CAP70, que regulan tanto su localización subcelular como su actividad. En estudios realizados en nuestro grupo (Navarro-Lerida et al., 2007) se observó que la unión de tanto EBP50 recombinante como CAP70 recombinante a la iNOS da lugar a un aumento en la población de dímeros activos de iNOS lo cual explica el aumento en la capacidad de síntesis de •NO que se observa.

La determinación de la actividad mediante la medida de reducción de citocromo *c* del dominio reductasa silvestre de la iNOS tras la incubación con concentraciones crecientes de cada una de las proteínas PDZ, muestra un aumento en la capacidad de reducción de citocromo *c*, aumentando ésta hasta casi tres veces más para la máxima concentración de EBP50 ensayada y hasta casi el doble en el caso de CAP70 (Figura 36).

Así pues la delección progresiva de la “tapadera” carboxi-terminal, conlleva un aumento en la velocidad de transferencia de electrones desde el NADPH, al FAD, de éste al FMN y finalmente al aceptor artificial, el citocromo *c*, transferencia que aún se ve más favorecida si en lugar de llevar a cabo una delección artificial, se incuba con las proteínas PDZ.

En estudios llevados a cabo con la nNOS, Miller y col. (Miller et al., 1999a) y Noble y col. (Noble et al., 1999), demostraron la formación de una semiquinona estable al aire (una forma reducida con un electrón), la cual no podía reducir su propio hemo o el del citocromo *c* y que era estable durante 20 minutos antes de revertir a la forma completamente oxidada. Este comportamiento redox es reminiscente del observado en CYPOR. Este hecho ha llevado a especular que el dominio flavoproteína de las NOSs opera a través de un mecanismo similar, si no idéntico al de CYPOR. Roman y colaboradores (Roman et al., 2000b), para estudiar si el extremo C-terminal de la iNOS afectaba a este proceso, estudiaron la tasa de reoxidación de flavinas empleando el dominio reductasa de la iNOS de macrófago de ratón en su forma silvestre y el mutante de delección $\Delta 21$, que carece de la “tapadera” completamente. Comprobaron que el NADPH era empleado 5 veces más rápido por la forma troncada ya que el *plateau* antes de que la absorbancia aumentara a la longitud de onda seleccionada (en su caso 485 nm), aumento que es un reflejo de la reoxidación de las flavinas, era 5 veces mayor para el dominio reductasa silvestre. Observaron que, si bien el dominio reductasa silvestre antes de volver a su estado completamente oxidado forma durante un tiempo la semiquinona estable (FADH•), la delección de los 21 aminoácidos C-terminales acelera hasta tal punto la velocidad de transferencia de electrones que no se forma la semiquinona, detectándose directamente la forma completamente oxidada.

En los experimentos de reoxidación de flavinas llevados a cabo con los mutantes $\Delta 10$ y $\Delta 15$ del dominio reductasa, en comparación con la forma silvestre, observamos que la delección progresiva de 10 y 15 aa acelera la velocidad de formación de la semiquinona ya que el *plateau* antes de que se forme la

semiquinona es menor a medida que se trunca la proteína (Figura 37). Esto se correlaciona con el aumento en la velocidad de transferencia de electrones comentado anteriormente, si bien a diferencia del mutante $\Delta 21$, en nuestro caso sí que observamos la formación de la semiquinona. Del mismo modo, la incubación con EBP50, si bien esperábamos que no se detectara la formación de la semiquinona, también llevó a la formación de la semiquinona en un tiempo menor en comparación con el dominio reductasa silvestre aislado (Figura 39).

A continuación procedimos a valorar la formación de $\bullet\text{NO}$ por la proteína completa, tanto para la forma silvestre como para los dos mutantes de delección que logramos clonar ($\Delta 5$ y $\Delta 10$) (Figura 40). De nuevo comprobamos que la delección progresiva también conlleva un aumento en los niveles de formación de $\bullet\text{NO}$, si bien el aumento no es tan acusado comparado con el incremento observado en la velocidad de reducción de citocromo *c*. Se debe tener en cuenta en este contexto, que la tasa de transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio hemo, determina las tasas de *turnover* de producción de $\bullet\text{NO}$ en las distintas NOSs (Nishida y de Montellano, 2001) y las delecciones en el dominio reductasa podrían conferir la capacidad de regular la transferencia de electrones a través de este dominio. Del mismo modo la incubación con cada una de las proteínas PDZ llevó a un aumento en la formación de $\bullet\text{NO}$, aumento mucho mayor que el obtenido para los mutantes de delección (Figura 41).

Así pues, la interacción de la iNOS a través de su extremo C-terminal con las distintas NHERFs no sólo implica la translocación de la iNOS hacia la localización subcelular adecuada, sino que dado el considerable aumento en la actividad reductasa y $\bullet\text{NO}$ sintasa, esta interacción supone un mecanismo de activación de la proteína. Al igual que la fosforilación en el caso de la eNOS y de la nNOS, la unión de estas proteínas PDZ supone la retirada de la hélice α presente en el extremo carboxi-terminal de la iNOS la cual funciona como un elemento autoinhibitorio (Figura 42).

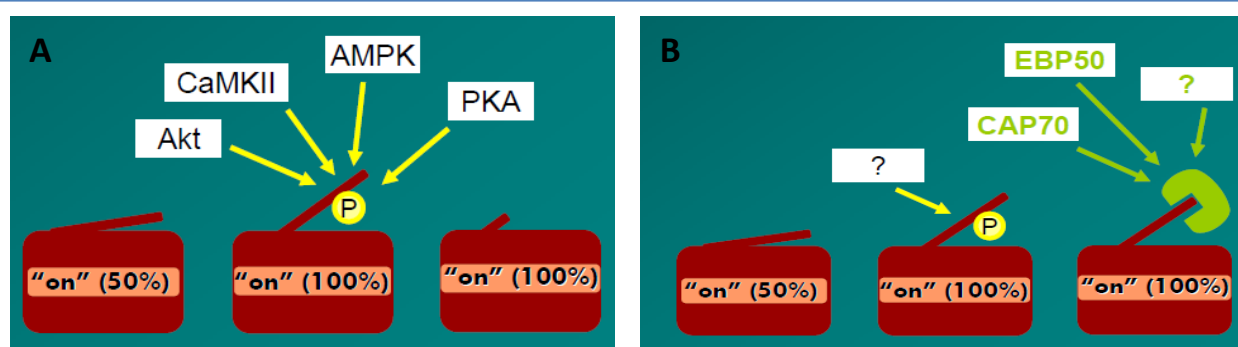


Figura 42. Modelo de activación mediante la retirada de la “cola” C-terminal presente en las NOSs y que funciona a modo de tapadera dificultando la transferencia de electrones. (A) En las isoformas constitutivas, eNOS y nNOS, la fosforilación de un residuo de Ser conservado por diversas quinasas que convergen en dicha posición, induce un cambio conformacional que aumenta el flujo de electrones hacia el dominio oxigenasa, aumentando así la producción de $\bullet\text{NO}$. (B) En la isoforma inducible, el extremo C-terminal constituye un motivo de unión a dominios PDZ de modo que la interacción con proteínas que tiene dominios PDZ, como EBP50 y CAP70, induce la retirada del lazo autoinhibitorio.



CONCLUSIONES

- Mediante un ensayo quinasa *in vitro* realizado con las proteínas recombinantes purificadas y análisis de los péptidos trípticos por espectrometría de masas se ha demostrado que PKD fosforila *in vitro* a la eNOS en la Ser1179 activadora. La fosforilación por PKD de la eNOS en esta posición fue confirmada mediante inmunodetección empleando un anticuerpo específico que reconoce esta Ser fosforilada.
- La fosforilación de la Ser1179 de la eNOS bovina por PKD también ocurre *in vivo*, tal y como se ha demostrado en experimentos de transfección realizados en células endoteliales BAEC o en células HEK293T.
- La fosforilación de la Ser1179 de la eNOS por PKD tiene un efecto activador ya que estimula la producción de •NO lo cual se ha determinado mediante el empleo de un sensor de •NO fluorescente, DAF2-DA, y mediante la valoración de los niveles de la proteína VASP fosforilada en la Ser239, un marcador bioquímico de los niveles de •NO en células vivas.
- Los resultados presentados también demuestran que la PKD forma un complejo con la eNOS, y dicha asociación depende del dominio NADPH de la eNOS, pero no de su módulo C-terminal.
- Se ha demostrado que el estímulo celular VEGF induce la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 por PKD en células endoteliales, y lo mismo ocurre con PDBu, un potente activador de PKD.
- El tratamiento de células endoteliales BAEC con VEGF conduce a un cambio en la localización subcelular tanto de la eNOS como de PKD1/2, mientras que el tratamiento con PDBu sólo afecta a la localización de la quinasa.
- Los resultados obtenidos en los ensayos de reparación de herida (*wound healing*) demuestran que la inhibición de PKD disminuye de forma notable la migración de las células BAEC, y proponemos que el mecanismo por el que la inhibición de PKD causa estos efectos pueda deberse al menos en parte a la incapacidad de fosforilar y activar a la eNOS.
- Estos descubrimientos establecen un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis de •NO mediado por PKD en el sistema cardiovascular.
- Mediante un ensayo quinasa *in vitro* realizado con las proteínas recombinantes purificadas y análisis de los péptidos trípticos por espectrometría de masas se ha demostrado que PKD fosforila *in vitro* a la nNOS en la Ser1412 activadora. La fosforilación por PKD de la nNOS en esta posición fue confirmada mediante

inmunodetección empleando un anticuerpo específico que reconoce esta Ser fosforilada.

- La fosforilación de la Ser1412 de la nNOS de rata por PKD también ocurre *in vivo*, tal y como se ha demostrado en experimentos de transfección realizados en células HEK293T.

- La fosforilación de la Ser1412 de la nNOS por PKD tiene un efecto activador ya que estimula la producción de •NO lo cual se ha determinado mediante el empleo de un sensor de •NO fluorescente, DAF2-DA, y mediante la valoración de los niveles de la proteína VASP fosforilada en la Ser239, un marcador bioquímico de los niveles de •NO en células vivas.

- Los resultados obtenidos muestran que la asociación de nNOS y PKD depende del dominio PH de PKD y de la actividad de la quinasa pero no de su motivo de unión a dominios PDZ. La activación de la quinasa aumenta la formación del complejo heterodimérico, y nNOS es el primer sustrato descrito de PKD cuya asociación con la quinasa aumenta tras la activación de la misma.

- Estos descubrimientos establecen un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis de •NO en el sistema nervioso, mediado por PKD.

- El descubrimiento de estos dos nuevos papeles de PKD, la fosforilación y activación de la eNOS y la nNOS que son biológicamente tan relevantes, abre la perspectiva de que PKD esté implicada en el control de procesos fisiológicos y patológicos en la que estos dos mediadores puedan estar implicados, tanto en el sistema cardiovascular como en el sistema nervioso.

- Tras la comparación de la actividad reductasa y óxido nítrico sintasa, y la tasa de reoxidación de flavinas de los distintos mutantes de delección ($\Delta 5$, $\Delta 10$, $\Delta 15$) tanto de la iNOS completa como del dominio reductasa que han sido clonados, expresados y purificados, concluimos que la delección progresiva de al menos 10 aminoácidos aumenta su actividad.

- La incubación de las proteínas silvestres iNOS completa o el dominio reductasa con las proteínas PDZ recombinantes purificadas EBP50 y CAP70, aumenta significativamente su capacidad de reducción de citocromo c y en el caso de la proteína completa la síntesis de •NO.

- Así pues, al igual que en el caso de las isoformas de NOSs constitutivas, el módulo carboxi-terminal regula la actividad de la enzima limitando el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio hemo-oxigenasa.



REFERENCIAS

- Adak, S., Santolini, J., Tikunova, S., Wang, Q., Johnson, J.D., and Stuehr, D.J. (2001). Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem* 276, 1244-1252.
- Adams, M.E., Anderson, K.N., and Froehner, S.C. (2010). The alpha-syntrophin PH and PDZ domains scaffold acetylcholine receptors, utrophin, and neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 30, 11004-11010.
- Adams, M.E., Mueller, H.A., and Froehner, S.C. (2001). In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol* 155, 113-122.
- Adams, V., Krabbes, S., Jiang, H., Yu, J.T., Rahmel, A., Gielen, S., Schuler, G., and Hambrecht, R. (1998). Complete coding sequence of inducible nitric oxide synthase from human heart and skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 2, 242-249.
- Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature Medicine* 9, 1370-1376.
- Alheid, U., Frolich, J.C., and Forstermann, U. (1987). Endothelium-Derived Relaxing Factor from Cultured Human-Endothelial Cells Inhibits Aggregation of Human-Platelets. *Thrombosis Research* 47, 561-571.
- Arndt, H., Smith, C.W., and Granger, D.N. (1993). Leukocyte-Endothelial Cell-Adhesion in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Hypertension* 21, 667-673.
- Azoitei, N., Pusapati, G.V., Kleger, A., Moller, P., Kufer, R., Genze, F., Wagner, M., van Lint, J., Carmeliet, P., Adler, G., *et al.* (2010). Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* 59, 1316-1330.
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., and Cook, W.J. (1985). Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315, 37-40.
- Banerjee, R., Chen, Z., and Gulati, S. (1997). Methionine synthase from pig liver. *Methods Enzymol* 281, 189-196.
- Batchelor, A.M., Bartus, K., Reynell, C., Constantinou, S., Halvey, E.J., Held, K.F., Dostmann, W.R., Vernon, J., and Garthwaite, J. (2010). Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22060-22065.
- Bauer, P.M., Fulton, D., Boo, Y.C., Sorescu, G.P., Kemp, B.E., Jo, H., and Sessa, W.C. (2003). Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple-serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 278, 14841-14849.
- Bender, A.T., Silverstein, A.M., Demady, D.R., Kanelakis, K.C., Noguchi, S., Pratt, W.B., and Osawa, Y. (1999). Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the hsp90-based chaperone system in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 274, 1472-1478.
- Billecke, S.S., Bender, A.T., Kanelakis, K.C., Murphy, P.J., Lowe, E.R., Kamada, Y., Pratt, W.B., and Osawa, Y. (2002). hsp90 is required for heme binding and activation of apo-neuronal nitric-oxide synthase: geldanamycin-mediated oxidant generation is unrelated to any action of hsp90. *J Biol Chem* 277, 20504-20509.
- Bisbal, M., Conde, C., Donoso, M., Bollati, F., Sesma, J., Quiroga, S., Diaz Anel, A., Malhotra, V., Marzolo, M.P., and Caceres, A. (2008). Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *J Neurosci* 28, 9297-9308.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2, 907-916.
- Bohme, G.A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J.M., Doble, A., and Blanchard, J.C. (1993). Altered Synaptic Plasticity and Memory Formation in Nitric-Oxide Synthase Inhibitor-Treated Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9191-9194.
- Boo, Y.C., Hwang, J., Sykes, M., Michell, B.J., Kemp, B.E., Lum, H., and Jo, H. (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283, H1819-H1828.
- Brandlin, I., Hubner, S., Eiseler, T., Martinez-Moya, M., Horschinek, A., Hausser, A., Link, G., Rupp, S., Storz, P., Pfizenmaier, K., *et al.* (2002). Protein kinase C (PKC) eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways. *Journal of Biological Chemistry* 277, 6490-6496.
- Bretz, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718.
- Bretz, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682-685.
- Breeden, L., and Nasmyth, K. (1985). Regulation of the Yeast Ho Gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 50, 643-650.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., *et al.* (1996a). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bretz, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.
- Brenman, J.E., Christopherson, K.S., Craven, S.E., McGee, A.W., and Bretz, D.S. (1996b). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16, 7407-7415.
- Brose, N., Betz, A., and Wegmeyer, H. (2004). Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 328-340.
- Brown, G.C. (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 23, 153-165.

- Brune, B., Dimmeler, S., Vedia, L.M.Y., and Lapetina, E.G. (1994). Nitric-Oxide - a Signal for Adp-Ribosylation of Proteins. *Life Sciences* 54, 61-70.
- Busse, R., Luckhoff, A., and Bassenge, E. (1987). Endothelium-Derived Relaxant Factor Inhibits Platelet Activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 336, 566-571.
- Busse, R., and Mulsch, A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265, 133-136.
- Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M., and Schmidt, H.H.H.W. (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5179-5187.
- Cao, S., Yao, J., McCabe, T.J., Yao, Q., Katusic, Z.S., Sessa, W.C., and Shah, V. (2001). Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function. *J Biol Chem* 276, 14249-14256.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Celil, A.B., and Campbell, P.G. (2005). BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 280, 31353-31359.
- Colon-Gonzalez, F., and Kazanietz, M.G. (2006). C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761, 827-837.
- Cowell, C.F., Doppler, H., Yan, I.K., Hausser, A., Umezawa, Y., and Storz, P. (2009). Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase-D1-mediated ROS signaling. *Journal of Cell Science* 122, 919-928.
- Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C.Q., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., and Tainer, J.A. (1998). Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279, 2121-2126.
- Crane, B.R., Rosenfeld, R.J., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Ghosh, S., Tainer, J.A., Stuehr, D.J., and Getzoff, E.D. (1999). N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo Journal* 18, 6271-6281.
- Cui, H., Hayashi, A., Sun, H.S., Belmares, M.P., Cobey, C., Phan, T., Schweizer, J., Salter, M.W., Wang, Y.T., Tasker, R.A., *et al.* (2007). PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J Neurosci* 27, 9901-9915.
- Czondor, K., Ellwanger, K., Fuchs, Y.F., Lutz, S., Gulyas, M., Mansuy, I.M., Hausser, A., Pfizenmaier, K., and Schlett, K. (2009). Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 20, 2108-2120.
- Charles, I.G., Palmer, R.M.J., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W., and Moncada, S. (1993). Cloning, Characterization, and Expression of a Cdna-Encoding an Inducible Nitric-Oxide Synthase from the Human Chondrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11419-11423.
- Chen, J.J., Tu, Y.J., Moon, C., Matarazzo, V., Palmer, A.M., and Ronnett, G.V. (2004). The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Developmental Biology* 269, 165-182.
- Chen, P.F., and Wu, K.K. (2000). Characterization of the roles of the 594-645 region in human endothelial nitric-oxide synthase in regulating calmodulin binding and electron transfer. *J Biol Chem* 275, 13155-13163.
- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R.D., Petersen, J.D., Nakagawa, T., Phillips, T.M., Sheng, M., and Reese, T.S. (2005). Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11551-11556.
- Chen, Z.P., McConell, G.K., Michell, B.J., Snow, R.J., Canny, B.J., and Kemp, B.E. (2000). AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1202-1206.
- Chen, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., and Kemp, B.E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443, 285-289.
- Chiu, T., and Rozengurt, E. (2001a). CCK2 (CCKB/gastrin) receptor mediates rapid protein kinase D (PKD) activation through a protein kinase C-dependent pathway. *Febs Letters* 489, 101-106.
- Chiu, T., and Rozengurt, E. (2001b). PKD in intestinal epithelial cells: rapid activation by phorbol esters, LPA, and angiotensin through PKC. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280, C929-C942.
- Chiu, T., Wu, S.S., Santiskulvong, C., Tangkijvanich, P., Yee, H.F., and Rozengurt, E. (2002). Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282, C434-C450.
- Chiu, T.T., Leung, W.Y., Moyer, M.P., Strieter, R.M., and Rozengurt, E. (2007). Protein kinase D-2 mediates lysophosphatidic acid-induced interleukin 8 production in nontransformed human colonic epithelial cells through NF-kappa B. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292, C767-C777.
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., and Nathan, C. (1992). Calmodulin Is a Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 176, 599-604.
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., and Bredt, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274, 27467-27473.
- Daff, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (1999). The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem* 274, 30589-30595.

- Davis, A.S., Vergne, I., Master, S.S., Kyei, G.B., Chua, J., and Deretic, V. (2007). Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *Plos Pathogens* 3, 1887-1894.
- Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R., Wattiez, R., and Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 201, 793-804.
- Dignam, J.D., and Strobel, H.W. (1975). Preparation of homogeneous NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 63, 845-852.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. (1999). Nitric oxide - an endothelial cell survival factor. *Cell Death and Differentiation* 6, 964-968.
- Ding, G., Sonoda, H., Yu, H., Kajimoto, T., Goparaju, S.K., Jahangeer, S., Okada, T., and Nakamura, S. (2007). Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J Biol Chem* 282, 27493-27502.
- Doppler, H., and Storz, P. (2007). A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation. *J Biol Chem* 282, 31873-31881.
- Doppler, H., Storz, P., Li, J., Comb, M.J., and Toker, A. (2005). A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 280, 15013-15019.
- Doucet, M.V., Harkin, A., and Dev, K.K. (2012). The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression? *Pharmacol Ther* 133, 218-229.
- Du, C., Jaggi, M., Zhang, C., and Balaji, K.C. (2009). Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer Res* 69, 1117-1124.
- Du, C., Zhang, C., Hassan, S., Biswas, M.H., and Balaji, K.C. (2010). Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res* 70, 7810-7819.
- Dudzinski, D.M., and Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75, 247-260.
- Dunbar, A.Y., Kamada, Y., Jenkins, G.J., Lowe, E.R., Billecke, S.S., and Osawa, Y. (2004). Ubiquitination and degradation of neuronal nitric-oxide synthase in vitro: Dimer stabilization protects the enzyme from proteolysis. *Molecular Pharmacology* 66, 964-969.
- Dusserre, N., L'Heureux, N., Bell, K.S., Stevens, H.Y., Yeh, J., Otte, L.A., Loufrani, L., and Frangos, J.A. (2004). PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1796-1802.
- Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I.K., Kitatani, K., Mizuno, K., and Storz, P. (2009). Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol* 11, 545-556.
- Eiseler, T., Hausser, A., De Kimpe, L., Van Lint, J., and Pfizenmaier, K. (2010). Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* 285, 18672-18683.
- Elkari, A.O., Sheng, J.J., Betz, A.L., and Malvin, R.L. (1993). The Central Effects of a Nitric-Oxide Synthase Inhibitor (N-Omega-Nitro-L-Arginine) on Blood-Pressure and Plasma-Renin. *Clinical and Experimental Hypertension* 15, 819-832.
- Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe, D., and Datta, R. (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C mu by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18476-18481.
- Felley-Bosco, E., Bender, F.C., Courjault-Gautier, F., Bron, C., and Quest, A.F.G. (2000). Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14334-14339.
- Feng, C. (2012). Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions. *Coord Chem Rev* 256, 393-411.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Firestein, B.L., and Bredt, D.S. (1999). Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M. *J Biol Chem* 274, 10545-10550.
- Fischmann, T.O., Hruza, A., Niu, X.D., Fossetta, J.D., Lunn, C.A., Dolphin, E., Prongay, A.J., Reichert, P., Lundell, D.J., Narula, S.K., et al. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural Biology* 6, 233-242.
- Fisslthaler, B., Loot, A.E., Mohamed, A., Busse, R., and Fleming, I. (2008). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circulation Research* 102, 1520-1528.
- Fleming, I. (2010). Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 459, 793-806.
- Fleming, I., and Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284, R1-R12.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., and Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation Research* 88, E68-E75.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.

- Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90, 866-873.
- Forstermann, U. (2000). Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In *Handbook of Experimental Pharmacology-Nitric Oxide*, M. B, ed. (Berlin, Springer), pp. 71-91.
- Forstermann, U. (2008). Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 5, 338-349.
- Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. (1994). Nitric-Oxide Synthase Isozymes - Characterization, Purification, Molecular-Cloning, and Functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.
- Forstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E., and Busse, R. (1986). Stimulation of Soluble Guanylate-Cyclase by an Acetylcholine-Induced Endothelium-Derived Factor from Rabbit and Canine Arteries. *Circulation Research* 58, 531-538.
- Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837, 837a-837d.
- Fu, Y., Ren, M., Feng, H., Chen, L., Altun, Z.F., and Rubin, C.S. (2009). Neuronal and Intestinal Protein Kinase D Isoforms Mediate Na⁺ (Salt Taste)-Induced Learning. *Science Signaling* 2.
- Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., and Olayioye, M.A. (2007). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 178, 15-22.
- Fulton, D., Church, J.E., Ruan, L., Li, C.Y., Sood, S.G., Kemp, B.E., Jennings, I.G., and Venema, R.C. (2005). Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35943-35952.
- Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J.P., Lin, M., Li, K.X., Michell, B., Kemp, B.E., Rodman, D., and Sessa, W.C. (2002). Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 277, 4277-4284.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.
- Fulton, D., Ruan, L., Sood, S.G., Li, C.Y., Zhang, Q., and Venema, R.C. (2008). Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation - Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circulation Research* 102, 497-504.
- Gallis, B., Corthals, G.L., Goodlett, D.R., Ueba, H., Kim, F., Presnell, S.R., Figeys, D., Harrison, D.G., Berk, B.C., Aebersold, R., *et al.* (1999). Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30101-30108.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824.
- Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272, 25437-25440.
- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.E., and Sessa, W.C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6448-6453.
- Garcin, E.D., Bruns, C.M., Lloyd, S.J., Hosfield, D.J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D.J., Tainer, J.A., and Getzoff, E.D. (2004). Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 279, 37918-37927.
- Garg, U.C., and Hassid, A. (1989). Nitric Oxide-Generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine-Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth-Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation* 83, 1774-1777.
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27, 2783-2802.
- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Disilvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H., and Billiar, T.R. (1993). Molecular-Cloning and Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase from Human Hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3491-3495.
- Gerber, N.C., Rodriguez-Crespo, I., Nishida, C.R., and Ortiz de Montellano, P.R. (1997). Active site topologies and cofactor-mediated conformational changes of nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 272, 6285-6290.
- Ghosh, D.K., Wu, C.Q., Pitters, E., Moloney, M., Werner, E.R., Mayer, B., and Stuehr, D.J. (1997). Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *Biochemistry* 36, 10609-10619.
- Ghosh, S., Gachhui, R., Crooks, C., Wu, C., Lisanti, M.P., and Stuehr, D.J. (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem* 273, 22267-22271.
- Glynn, P.A., Darling, K.E.A., Picot, J., and Evans, T.J. (2002). Epithelial inducible nitric-oxide synthase is an apical EBP50-binding protein that directs vectorial nitric oxide output. *Journal of Biological Chemistry* 277, 33132-33138.
- Govers, R., and Rabelink, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 280, F193-F206.
- Gratton, J.P., Fontana, J., O'Connor, D.S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T.J., and Sessa, W.C. (2000). Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275, 22268-22272.
- Greif, D.M., Sacks, D.B., and Michel, T. (2004). Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1165-1170.

- Guan, Z.W., and Iyanagi, T. (2003). Electron transfer is activated by calmodulin in the flavin domain of human neuronal nitric oxide synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412, 65-76.
- Gudi, T., Hong, G.K.P., Vaandrager, A.B., Lohmann, S.M., and Pilz, R.B. (1999). Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. *Faseb Journal* 13, 2143-2152.
- Guha, S., Rey, O., and Rozengurt, E. (2002). Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Research* 62, 1632-1640.
- Guo, F.H., Deraeve, H.R., Rice, T.W., Stuehr, D.J., Thunnissen, F.B.J.M., and Erzurum, S.C. (1995). Continuous Nitric-Oxide Synthesis by Inducible Nitric-Oxide Synthase in Normal Human Airway Epithelium in-Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7809-7813.
- Ha, C.H., Jhun, B.S., Kao, H.Y., and Jin, Z.G. (2008a). VEGF stimulates HDAC7 phosphorylation and cytoplasmic accumulation modulating matrix metalloproteinase expression and angiogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 28, 1782-1788.
- Ha, C.H., Wang, W., Jhun, B.S., Wong, C., Hausser, A., Pfizenmaier, K., McKinsey, T.A., Olson, E.N., and Jin, Z.G. (2008b). Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5 mediates vascular endothelial growth factor-induced gene expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14590-14599.
- Han, R.N.N., and Stewart, D.J. (2006). Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Trends in Cardiovascular Medicine* 16, 29-34.
- Hao, Q., Wang, L., Zhao, Z.J., and Tang, H. (2009). Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Biol Chem* 284, 799-806.
- Hare, J.M. (2003). Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35, 719-729.
- Harris, M.B., Ju, H., Venema, V.J., Liang, H.Y., Zou, R., Michell, B.J., Chen, Z.P., Kemp, B.E., and Venema, R.C. (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 16587-16591.
- Hausel, P., Latado, H., Courjault-Gautier, F., and Felley-Bosco, E. (2006). Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase. *Oncogene* 25, 198-206.
- Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K., and Johannes, F.J. (2002). Structural requirements for localization and activation of protein kinase C μ (PKC μ) at the Golgi compartment. *J Cell Biol* 156, 65-74.
- Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A., and Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 7, 880-886.
- Haworth, R.S., Cuello, F., Herron, T.J., Franzen, G., Kentish, J.C., Gautel, M., and Avkiran, M. (2004). Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res* 95, 1091-1099.
- Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., and Saito, T. (1999). PKC η , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim Biophys Acta* 1450, 99-106.
- Hecker, M., Mulsch, A., and Busse, R. (1994). Subcellular-Localization and Characterization of Neuronal Nitric-Oxide Synthase. *Journal of Neurochemistry* 62, 1524-1529.
- Hemmens, B., Goessler, W., Schmidt, K., and Mayer, B. (2000). Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 35786-35791.
- Hemmens, B., and Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol* 100, 1-32.
- Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Bredt, D.S., and Lim, W.A. (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284, 812-815.
- Hogan, M., Cerami, A., and Bucala, R. (1992). Advanced Glycosylation Endproducts Block the Antiproliferative Effect of Nitric-Oxide - Role in the Vascular and Renal Complications of Diabetes-Mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1110-1115.
- Holscher, C., and Rose, S.P.R. (1992). An Inhibitor of Nitric-Oxide Synthesis Prevents Memory Formation in the Chick. *Neuroscience Letters* 145, 165-167.
- Huang, P.L., Huang, Z.H., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in Mice Lacking the Gene for Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *Nature* 377, 239-242.
- Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: Structural modules for protein complex assembly. *Journal of Biological Chemistry* 277, 5699-5702.
- Hurd, C., Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2002). Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene* 21, 2154-2160.
- Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M.P., Naven, T.J., Rozengurt, E., and Schiavo, G. (2000). Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 275, 40048-40056.
- Iglesias, T., Matthews, S., and Rozengurt, E. (1998a). Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D. *FEBS Lett* 437, 19-23.
- Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1998). Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 273, 410-416.
- Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1999). Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs. *FEBS Lett* 454, 53-56.
- Iglesias, T., Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (1998b). Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* 273, 27662-27667.
- Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., and Kadowitz, P.J. (1986). Activation of Purified Soluble Guanylate-Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein - Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic-Acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 237, 893-900.

- Ilan, Z., Ilan, R., and Cinti, D.L. (1981). Evidence for a new physiological role of hepatic NADPH:ferricytochrome (P-450) oxidoreductase. Direct electron input to the microsomal fatty acid chain elongation system. *J Biol Chem* 256, 10066-10072.
- Izumi, Y., Clifford, D.B., and Zorumski, C.F. (1992). Inhibition of Long-Term Potentiation by Nmda-Mediated Nitric-Oxide Release. *Science* 257, 1273-1276.
- Izumi, Y., and Zorumski, C.F. (1993). Nitric-Oxide and Long-Term Synaptic Depression in the Rat Hippocampus. *Neuroreport* 4, 1131-1134.
- Jacamo, R., Sinnett-Smith, J., Rey, O., Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2008). Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via G(q)-coupled receptors - Differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12877-12887.
- Jachymova, M., Martasek, P., Panda, S., Roman, L.J., Panda, M., Shea, T.M., Ishimura, Y., Kim, J.J.P., and Masters, B.S.S. (2005). Recruitment of governing elements for electron transfer in the nitric oxide synthase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15833-15838.
- Jaffrey, S.R., Benfenati, F., Snowman, A.M., Czernik, A.J., and Snyder, S.H. (2002). Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3199-3204.
- Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J., Cohen, N.A., and Snyder, S.H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20, 115-124.
- Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P., and Balaji, K.C. (2005). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 483-492.
- Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J.R., Faulkner, D.J., and Malhotra, V. (1999). G beta gamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 98, 59-68.
- Jensen, E.D., Gopalakrishnan, R., and Westendorf, J.J. (2009). Bone Morphogenic Protein 2 Activates Protein Kinase D to Regulate Histone Deacetylase 7 Localization and Repression of Runx2. *Journal of Biological Chemistry* 284, 2225-2234.
- Jiang, J.H., Cyr, D., Babbitt, R.W., Sessa, W.C., and Patterson, C. (2003). Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49332-49341.
- Jiang, X.N., Mu, D.Z., Manabat, C., Koshy, A.A., Christen, S., Tauber, M.G., Vexler, Z.S., and Ferriero, D.M. (2004). Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. *Experimental Neurology* 190, 224-232.
- Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., and Pfizenmaier, K. (1994). PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269, 6140-6148.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., Rykx, A., Dragset, M., Vandenheede, J.R., Van Lint, J., and Moens, U. (2007). Protein kinase D induces transcription through direct phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 282, 14777-14787.
- Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272, 18522-18525.
- Kamada, Y., Jenkins, G.J., Lau, M., Dunbar, A.Y., Lowe, E.R., and Osawa, Y. (2005). Tetrahydrobiopterin depletion and ubiquitylation of neuronal nitric oxide synthase. *Molecular Brain Research* 142, 19-27.
- Kan, Z.Y., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverly, P.M., Bourgon, R., Zheng, J.B., et al. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869-U103.
- Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., and Medford, R.M. (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9114-9119.
- Kim, N., Azadzi, K.M., Goldstein, I., and Detejada, I.S. (1991). A Nitric-Oxide Like Factor Mediates Nonadrenergic-Noncholinergic Neurogenic Relaxation of Penile Corpus Cavernosum Smooth-Muscle. *Journal of Clinical Investigation* 88, 112-118.
- Knowles, R.G., and Moncada, S. (1994). Nitric-Oxide Synthases in Mammals. *Biochemical Journal* 298, 249-258.
- Knudsen, G.M., Nishida, C.R., Mooney, S.D., and Ortiz de Montellano, P.R. (2003). Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. *J Biol Chem* 278, 31814-31824.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T. (1998a). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* 70, 2446-2453.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T. (1998b). Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 46, 373-375.
- Korzhevski, D.E., Otellin, V.A., Grigor'ev, I.P., Petrova, E.S., Gilerovich, E.G., and Zin'kova, N.N. (2007). Immunocytochemical demonstration of neuronal NO-synthase in rat brain cells. *Morfologiya* 132, 77-80.
- Kou, R., Prabhakar, P., and Michel, T. (2001). Phosphorylation of the endothelial isoform of nitric oxide synthase at serine 116: Identification of a novel path for eNOS regulation by lysophosphatidic acid. *Circulation* 104, 105-105.
- Krueger, D.D., Osterweil, E.K., and Bear, M.F. (2010). Activation of mGluR5 induces rapid and long-lasting protein kinase D phosphorylation in hippocampal neurons. *J Mol Neurosci* 42, 1-8.
- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D.N. (1991). Nitric-Oxide - an Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4651-4655.

- Kunczewicz, T., Balakrishnan, P., Snuggs, M.B., and Kone, B.C. (2001). Specific association of nitric oxide synthase-2 with Rac isoforms in activated murine macrophages. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 281, F326-F336.
- Kunkel, M.T., Garcia, E.L., Kajimoto, T., Hall, R.A., and Newton, A.C. (2009). The Protein Scaffold NHERF-1 Controls the Amplitude and Duration of Localized Protein Kinase D Activity. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24653-24661.
- Kunkel, M.T., Toker, A., Tsien, R.Y., and Newton, A.C. (2007). Calcium-dependent regulation of protein kinase D revealed by a genetically encoded kinase activity reporter. *Journal of Biological Chemistry* 282, 6733-6742.
- Lai, Y., Zhao, J., Yue, Y., and Duan, D. (2013). $\alpha 2$ and $\alpha 3$ helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the $\alpha 1$ helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 525-530.
- Lajoix, A.D., Pugniere, M., Roquet, F., Mani, J.C., Dietz, S., Linck, N., Faurie, F., Ribes, G., Petit, P., and Gross, R. (2004). Changes in the dimeric state of neuronal nitric oxide synthase affect the kinetics of secretagogue-induced insulin response. *Diabetes* 53, 1467-1474.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., and Michel, T. (1992a). Endothelial Nitric-Oxide Synthase - Molecular-Cloning and Characterization of a Distinct Constitutive Enzyme Isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6348-6352.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., and Michel, T. (1992b). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6348-6352.
- Lane, P., and Gross, S.S. (2002). Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli. *J Biol Chem* 277, 19087-19094.
- Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H., Rommens, J.M., Scherer, S.W., Rosenblatt, D.S., et al. (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3059-3064.
- Lee, J.H., Yang, E.S., and Park, J.W. (2003). Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite - Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury. *Journal of Biological Chemistry* 278, 51360-51371.
- Lefebvre, R.A. (2002). Pharmacological characterization of the nitrergic innervation of the stomach. *Verh K Acad Geneesk Belg* 64, 151-166.
- Lemonnier, J., Ghayor, C., Guicheux, J., and Caverzasio, J. (2004). Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 259-264.
- Li, H., Oehrlin, S.A., Wallerath, T., Ihrig-Biedert, I., Wohlfart, P., Ulshofer, T., Jessen, T., Herget, T., Forstermann, U., and Kleinert, H. (1998). Activation of protein kinase C α and/or ϵ enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53, 630-637.
- Li, H.Y., and Poulos, T.L. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 293-305.
- Li, J.R., Billiar, T.R., Talanian, R.V., and Kim, Y.M. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, 419-424.
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., and Malhotra, V. (2001). Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104, 409-420.
- Lin, M.I., Fulton, D., Babbitt, R., Fleming, I., Busse, R., Pritchard, K.A., and Sessa, W.C. (2003). Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry* 278, 44719-44726.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z.Z., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993). A Redox-Based Mechanism for the Neuroprotective and Neurodestructive Effects of Nitric-Oxide and Related Nitroso-Compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Liu, J., Garcia-Cardena, G., and Sessa, W.C. (1996). Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* 35, 13277-13281.
- Liu, J., Hughes, T.E., and Sessa, W.C. (1997). The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J Cell Biol* 137, 1525-1535.
- Liu, X.B., Hill, P., and Haile, D.J. (2002). Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation. *Blood Cells Molecules and Diseases* 29, 315-326.
- Luo, C.X., and Zhu, D.Y. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. *Neurosci Bull* 27, 23-35.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15, 323-350.
- Maeda, Y., Beznoussenko, G.V., Van Lint, J., Mironov, A.A., and Malhotra, V. (2001). Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J* 20, 5982-5990.
- Mancheño-Gómez, J.M., and Angulo-Herrera, I. (2009) (WO/2009/121994).
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-+.
- Marletta, M.A. (1994). Nitric-Oxide Synthase - Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell* 78, 927-930.
- Marrero, M.B., Venema, V.J., Ju, H., He, H., Liang, H., Caldwell, R.B., and Venema, R.C. (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 343 Pt 2, 335-340.

- Martinez-Ruiz, A., Villanueva, L., Gonzalez de Orduna, C., Lopez-Ferrer, D., Higuera, M.A., Tarin, C., Rodriguez-Crespo, I., Vazquez, J., and Lamas, S. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8525-8530.
- Masters, B.S.S. (1994). Nitric-Oxide Synthases - Why So Complex. *Annual Review of Nutrition* 14, 131-145.
- Matsubara, M., Titani, K., and Taniguchi, H. (1996). Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: Regulation by protein phosphorylation and Ca²⁺-calmodulin. *Biochemistry* 35, 14651-14658.
- Matsuda, H., and Iyanagi, T. (1999). Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1473, 345-355.
- Matthews, S., Iglesias, T., Cantrell, D., and Rozengurt, E. (1999a). Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation. *FEBS Lett* 457, 515-521.
- Matthews, S.A., Dayalu, R., Thompson, L.J., and Scharenberg, A.M. (2003). Regulation of protein kinase C γ by the B-cell antigen receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9086-9091.
- Matthews, S.A., Iglesias, T., Rozengurt, E., and Cantrell, D. (2000). Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *EMBO J* 19, 2935-2945.
- Matthews, S.A., Rozengurt, E., and Cantrell, D. (1999b). Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase C μ . *J Biol Chem* 274, 26543-26549.
- McCabe, T.J., Fulton, D., Roman, L.J., and Sessa, W.C. (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 6123-6128.
- McLean, K.J., Girvan, H.M., and Munro, A.W. (2007). Cytochrome P450/redox partner fusion enzymes: biotechnological and toxicological prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 3, 847-863.
- Melikian, N., Seddon, M.D., Casadei, B., Chowieńczyk, P.J., and Shah, A.M. (2009). Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 19, 256-262.
- Michel, J.B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., and Michel, T. (1997). Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272, 25907-25912.
- Michel, T., and Vanhoutte, P.M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflügers Arch* 459, 807-816.
- Michell, B.J., Chen, Z.P., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., and Kemp, B.E. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 17625-17628.
- Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchellhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P.R., Kemp, B.E., and Pearson, R.B. (1999). The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 9, 845-848.
- Michell, B.J., Harris, M.B., Chen, Z.P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C., and Kemp, B.E. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42344-42351.
- Mihailovic, T., Marx, M., Auer, A., Van Lint, J., Schmid, M., Weber, C., and Seufferlein, T. (2004). Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappa B by Bcr-Abl in Bcr-Abl(+) human myeloid leukemia cells. *Cancer Research* 64, 8939-8944.
- Mikkelsen, R.B., and Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734-5754.
- Miller, R.T., Martasek, P., Omura, T., and Siler Masters, B.S. (1999a). Rapid kinetic studies of electron transfer in the three isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 184-188.
- Miller, R.T., Martasek, P., Raman, C.S., and Masters, B.S.S. (1999b). Zinc content of Escherichia coli-expressed constitutive isoforms of nitric-oxide synthase - Enzymatic activity and effect of pterin. *Journal of Biological Chemistry* 274, 14537-14540.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). Mechanisms of Disease - the L-Arginine Nitric-Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine* 329, 2002-2012.
- Montgomery, H.J., Romanov, V., and Guillemette, J.G. (2000). Removal of a putative inhibitory element reduces the calcium-dependent calmodulin activation of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 275, 5052-5058.
- Morrow, V.A., Fougère, F., Connell, J.M., Petrie, J.R., Gould, G.W., and Salt, I.P. (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 31629-31639.
- Mottet, D., Bellahcene, A., Pirotte, S., Waltregny, D., Deroanne, C., Lamour, V., Lidereau, R., and Castronovo, V. (2007). Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circulation Research* 101, 1237-1246.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D.H., Chen, D.F., Symes, J.F., et al. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *Journal of Clinical Investigation* 101, 2567-2578.
- Nakaki, T., Nakayama, M., and Kato, R. (1990). Inhibition by Nitric-Oxide and Nitric Oxide-Producing Vasodilators of DNA-Synthesis in Vascular Smooth-Muscle Cells. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* 189, 347-353.
- Nakane, M., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Forstermann, U., and Murad, F. (1993). Cloned Human Brain Nitric-Oxide Synthase Is Highly Expressed in Skeletal-Muscle. *FEBS Letters* 316, 175-180.
- Nathan, C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? *Journal of Clinical Investigation* 100, 2417-2423.
- Navarro-Lerida, I., Alvarez-Barrientos, A., and Rodriguez-Crespo, I. (2006). N-terminal palmitoylation within the appropriate amino acid environment conveys on NOS2 the ability to progress along the intracellular sorting pathways. *J Cell Sci* 119, 1558-1569.

- Navarro-Lerida, I., Corvi, M.M., Barrientos, A.A., Gavilanes, F., Berthiaume, L.G., and Rodriguez-Crespo, I. (2004). Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis. *J Biol Chem* 279, 55682-55689.
- Navarro-Lerida, I., Martinez-Moreno, M., Ventoso, I., Alvarez-Barrientos, A., and Rodriguez-Crespo, I. (2007). Binding of CAP70 to inducible nitric oxide synthase and implications for the vectorial release of nitric oxide in polarized cells. *Mol Biol Cell* 18, 2768-2777.
- Nhek, S., Ngo, M., Yang, X., Ng, M.M., Field, S.J., Asara, J.M., Ridgway, N.D., and Toker, A. (2010). Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell* 21, 2327-2337.
- Nishida, C.R., and de Montellano, P.R.O. (1998). Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases - Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5566-5571.
- Nishida, C.R., and de Montellano, P.R.O. (1999). Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase - Identification of an electron transfer control element. *Journal of Biological Chemistry* 274, 14692-14698.
- Nishida, C.R., and de Montellano, P.R.O. (2001). Control of electron transfer in nitric-oxide synthases - Swapping of autoinhibitory elements among nitric-oxide synthase isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20116-20124.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z., and Cantley, L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 272, 952-960.
- Noble, M.A., Munro, A.W., Rivers, S.L., Robledo, L., Daff, S.N., Yellowlees, L.J., Shimizu, T., Sagami, I., Guillemette, J.G., and Chapman, S.K. (1999). Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry* 38, 16413-16418.
- Nunokawa, Y., and Tanaka, S. (1992). Interferon-Gamma Inhibits Proliferation of Rat Vascular Smooth-Muscle Cells by Nitric-Oxide Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188, 409-415.
- Oancea, E., Bezzerides, V.J., Greka, A., and Clapham, D.E. (2003). Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Developmental Cell* 4, 561-574.
- Ochi, N., Tanasanvimon, S., Matsuo, Y., Tong, Z.M., Sung, B., Aggarwal, B.B., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E., and Guha, S. (2011). Protein Kinase D1 Promotes Anchorage-Independent Growth, Invasion, and Angiogenesis by Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology* 226, 1074-1081.
- Odell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., and Arancio, O. (1991). Tests of the Roles of 2 Diffusible Substances in Long-Term Potentiation - Evidence for Nitric-Oxide as a Possible Early Retrograde Messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11285-11289.
- Olteanu, H., and Banerjee, R. (2001). Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 276, 35558-35563.
- Paine, M.J., Garner, A.P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., Smith, T., Tew, D.G., and Wolf, C.R. (2000). Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J Biol Chem* 275, 1471-1478.
- Pan, J.M., Burgher, K.L., Szczepanik, A.M., and Ringheim, G.E. (1996). Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: Implications for potential post-translational regulation. *Biochemical Journal* 314, 889-894.
- Panda, K., Adak, S., Aulak, K.S., Santolini, J., McDonald, J.F., and Stuehr, D.J. (2003). Distinct influence of N-terminal elements on neuronal nitric-oxide synthase structure and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 37122-37131.
- Pantopoulos, K., and Hentze, M.W. (1995). Nitric-Oxide Signaling to Iron-Regulatory Protein - Direct Control of Ferritin Messenger-Rna Translation and Transferrin Receptor Messenger-Rna Stability in Transfected Fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1267-1271.
- Paolucci, L., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2000). Lysophosphatidic acid rapidly induces protein kinase D activation through a pertussis toxin-sensitive pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 278, C33-C39.
- Park, C.S., Park, R., and Krishna, G. (1996). Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sciences* 59, 219-225.
- Park, J.H., Kim, W.S., Kim, J.Y., Park, M.H., Nam, J.H., Yun, C.W., Kwon, Y.G., and Jo, I. (2011). Chk1 and Hsp90 cooperatively regulate phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179. *Free Radic Biol Med* 51, 2217-2226.
- Peterburs, P., Heering, J., Link, G., Pfizenmaier, K., Olayioye, M.A., and Hausser, A. (2009). Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like. *Cancer Res* 69, 5634-5638.
- Porter, T.D. (1991). An unusual yet strongly conserved flavoprotein reductase in bacteria and mammals. *Trends Biochem Sci* 16, 154-158.
- Pozdnyakov, N., Lloyd, A., Reddy, V.N., and Sitaramayya, A. (1993). Nitric Oxide-Regulated Endogenous Adp-Ribosylation of Rod Outer Segment Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192, 610-615.
- Presta, A., Siddhanta, U., Wu, C., Sennequier, N., Huang, L., Abu-Soud, H.M., Erzurum, S., and Stuehr, D.J. (1998). Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 37, 298-310.
- Pusapati, G.V., Eiseler, T., Rykx, A., Vandoninck, S., Derua, R., Waelkens, E., Van Lint, J., von Wichert, G., and Seufferlein, T. (2012). Protein kinase D regulates RhoA activity via rhotekin phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 9473-9483.
- Qiang, Y.W., Yao, L., Tosato, G., and Rudikoff, S. (2004). Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* 103, 301-308.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. (1987). The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium - Interactions between Prostacyclin and Nitric-Oxide. *British Journal of Pharmacology* 92, 639-646.

- Rajfer, J., Aronson, W.J., Bush, P.A., Dorey, F.J., and Ignarro, L.J. (1992). Nitric-Oxide as a Mediator of Relaxation of the Corpus Cavernosum in Response to Nonadrenergic, Noncholinergic Neurotransmission. *New England Journal of Medicine* 326, 90-94.
- Raman, C.S., Li, H.Y., Martasek, P., Kral, V., Masters, B.S.S., and Poulos, T.L. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95, 939-950.
- Rameau, G.A., Chiu, L.Y., and Ziff, E.B. (2004). Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 279, 14307-14314.
- Rameau, G.A., Tukey, D.S., Garcin-Hosfield, E.D., Titcombe, R.F., Misra, C., Khatri, L., Getzoff, E.D., and Ziff, E.B. (2007). Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* 27, 3445-3455.
- Rapoport, R.M., Draznin, M.B., and Murad, F. (1983). Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Aorta May Be Mediated through Cyclic Gmp-Dependent Protein-Phosphorylation. *Nature* 306, 174-176.
- Ratovitski, E.A., Alam, M.R., Quick, R.K., McMillan, A., Bao, C., Kozlovsky, C., Hand, T.A., Johnson, R.C., Mains, R.E., Eipper, B.A., *et al.* (1999a). Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 993-999.
- Ratovitski, E.A., Bao, C., Quick, R.A., McMillan, A., Kozlovsky, C., and Lowenstein, C.J. (1999b). An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30250-30257.
- Reif, A., Frohlich, L.G., Kotsonis, P., Frey, A., Bommel, H.M., Wink, D.A., Pfeleiderer, W., and Schmidt, H.H.H.W. (1999). Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24921-24929.
- Reinhart-King, C.A. (2008). Endothelial cell adhesion and migration. *Angiogenesis: In Vitro Systems* 443, 45-64.
- Retzlaff, M., Stahl, M., Eberl, H.C., Lagleder, S., Beck, J., Kessler, H., and Buchner, J. (2009). Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep* 10, 1147-1153.
- Rey, O., Papazyan, R., Waldron, R.T., Young, S.H., Lippincott-Schwartz, J., Jacamo, R., and Rozengurt, E. (2006). The nuclear import of protein kinase D3 requires its catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5149-5157.
- Rey, O., and Rozengurt, E. (2001). Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 21-26.
- Rey, O., Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., and Rozengurt, E. (2001a). Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 49228-49235.
- Rey, O., Young, S.H., Cantrell, D., and Rozengurt, E. (2001b). Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation - Dependence on protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32616-32626.
- Rey, O., Yuan, J.Z., and Rozengurt, E. (2003a). Intracellular redistribution of protein kinase D2 in response to G-protein-coupled receptor agonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302, 817-824.
- Rey, O., Yuan, J.Z., Young, S.H., and Rozengurt, E. (2003b). Protein kinase C nu/protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *Journal of Biological Chemistry* 278, 23773-23785.
- Rey, O., Zhukova, E., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2003c). Vasopressin-induced intracellular redistribution of protein kinase D in intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 196, 483-492.
- Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., and Wink, D.A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological Chemistry* 385, 1-10.
- Rodriguez-Crespo, I., Moenne-Loccoz, P., Loehr, T.M., and de Montellano, P.R.O. (1997). Endothelial nitric oxide synthase: Modulations of the distal heme site produced by progressive N-terminal deletions. *Biochemistry* 36, 8530-8538.
- Rodriguez-Crespo, I., Nishida, C.R., Knudsen, G.M., and de Montellano, P.R. (1999). Mutation of the five conserved histidines in the endothelial nitric-oxide synthase hemoprotein domain. No evidence for a non-heme metal requirement for catalysis. *J Biol Chem* 274, 21617-21624.
- Rodriguez-Crespo, I., and Ortiz de Montellano, P.R. (1996). Human endothelial nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, coexpression with calmodulin, and characterization. *Arch Biochem Biophys* 336, 151-156.
- Rodriguez-Crespo, I., Straub, W., Gavilanes, F., and Ortiz de Montellano, P.R. (1998). Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys* 359, 297-304.
- Rodriguez-Crespo, I., Gerber, N.C., and deMontellano, P.R.O. (1996). Endothelial nitric-oxide synthase - Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 11462-11467.
- Rogers, S.C., Khalatbari, A., Gapper, P.W., Frenneaux, M.P., and James, P.E. (2005). Detection of human red blood cell-bound nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26720-26728.
- Roman, L.J., Martasek, P., Miller, R.T., Harris, D.E., de la Garza, M.A., Shea, T.M., Kim, J.J.P., and Masters, B.S.S. (2000a). The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29225-29232.
- Roman, L.J., and Masters, B.S.S. (2006). Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. *Journal of Biological Chemistry* 281, 23111-23118.
- Roman, L.J., Miller, R.T., de la Garza, M.A., Kim, J.J.P., and Masters, B.S.S. (2000b). The C terminus of mouse macrophage inducible nitric-oxide synthase attenuates electron flow through the flavin domain. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21914-21919.

- Rossig, L., Haendeler, J., Hermann, C., Malchow, P., Urbich, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2000). Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels - Involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25502-25507.
- Rothe, F., Canzler, U., and Wolf, G. (1998). Subcellular localization of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the rat brain: A critical evaluation. *Neuroscience* 83, 259-269.
- Rozengurt, E. (2011). Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda)* 26, 23-33.
- Rozengurt, E., Rey, O., and Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13205-13208.
- Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S., and Sessa, W.C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation* 101, 731-736.
- Sabat, J., Egawa, T., Lu, C., Stuehr, D.J., Gerfen, G.J., Rousseau, D.L., and Yeh, S.R. (2013). Catalytic Intermediates of Inducible Nitric-oxide Synthase Stabilized by the W188H Mutation. *J Biol Chem* 288, 6095-6106.
- Saitoh, F., Tian, Q.B., Okano, A., Sakagami, H., Kondo, H., and Suzuki, T. (2004). NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to the synaptic membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity. *J Biol Chem* 279, 29461-29468.
- Sakuma, I., Togashi, H., Yoshioka, M., Saito, H., Yanagida, M., Tamura, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Gross, S.S., and Levi, R. (1992). Ng-Methyl-L-Arginine, an Inhibitor of L-Arginine-Derived Nitric-Oxide Synthesis, Stimulates Renal Sympathetic Nerve Activity In vivo - a Role for Nitric-Oxide in the Central Regulation of Sympathetic Tone? *Circulation Research* 70, 607-611.
- Salerno, J.C., Harris, D.E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A.J., Smith, S.M.E., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S.S., Jones, C.L., *et al.* (1997). An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29769-29777.
- Sanchez-Blazquez, P., Rodriguez-Munoz, M., and Garzon, J. (2010). Mu-opioid receptors transiently activate the Akt-nNOS pathway to produce sustained potentiation of PKC-mediated NMDAR-CaMKII signaling. *PLoS One* 5, e11278.
- Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Rodriguez-Martinez, M., Lopez-Menendez, C., Jean-Mairet, R.M., Higuero, A.M., and Iglesias, T. (2006). Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J Biol Chem* 281, 18888-18900.
- Sartoretto, J.L., Jin, B.Y., Bauer, M., Gertler, F.B., Liao, R., and Michel, T. (2009). Regulation of VASP phosphorylation in cardiac myocytes: differential regulation by cyclic nucleotides and modulation of protein expression in diabetic and hypertrophic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1697-1710.
- Sasaki, K., Heeschen, C., Aicher, A., Ziebart, T., Honold, J., Urbich, C., Rossig, L., Koehl, U., Koyanagi, M., Mohamed, A., *et al.* (2006). Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14537-14541.
- Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., and Masters, B.S. (1972). Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J Biol Chem* 247, 3601-3607.
- Scheele, J.S., Bruner, E., Zemojtel, T., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S.S., Sharma, V.S., and Magde, D. (2001). Kinetics of CO and NO ligation with the Cys(331) -> Ala mutant of neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4733-4736.
- Schepens, J., Cuppen, E., Wieringa, B., and Hendriks, W. (1997). The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E)XV* carboxyterminal sequences. *FEBS Lett* 409, 53-56.
- Schleicher, M., Yu, J., Murata, T., Derakhshan, B., Atochin, D., Qian, L., Kashiwagi, S., Di Lorenzo, A., Harrison, K.D., Huang, P.L., *et al.* (2009). The Akt1-eNOS Axis Illustrates the Specificity of Kinase-Substrate Relationships in Vivo. *Science Signaling* 2.
- Schmidt, H.H., Smith, R.M., Nakane, M., and Murad, F. (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent NO synthase type I: a biopteroflavoprotein with Ca²⁺/calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochemistry* 31, 3243-3249.
- Schneider, J.C., El Kebir, D., Chereau, C., Lanone, S., Huang, X.L., Roessingh, A.S.D., Mercier, J.C., Dall'Ava-Santucci, J., and Dinh-Xuan, A.T. (2003). Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284, H2311-H2319.
- Schuman, E.M., and Madison, D.V. (1991). A Requirement for the Intercellular Messenger Nitric-Oxide in Long-Term Potentiation. *Science* 254, 1503-1506.
- Schwarz, P.M., Kleinert, H., and Forstermann, U. (1999). Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 19, 2584-2590.
- Senzaki, H., Smith, C.J., Juang, G.J., Isoda, T., Mayer, S.P., Ohler, A., Paolocci, N., Tomaselli, G.F., Hare, J.M., and Kass, D.A. (2001). Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *Faseb Journal* 15, 1718-1726.
- Sessa, W.C. (2004). eNOS at a glance. *J Cell Sci* 117, 2427-2429.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G., and Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271, 6518-6522.

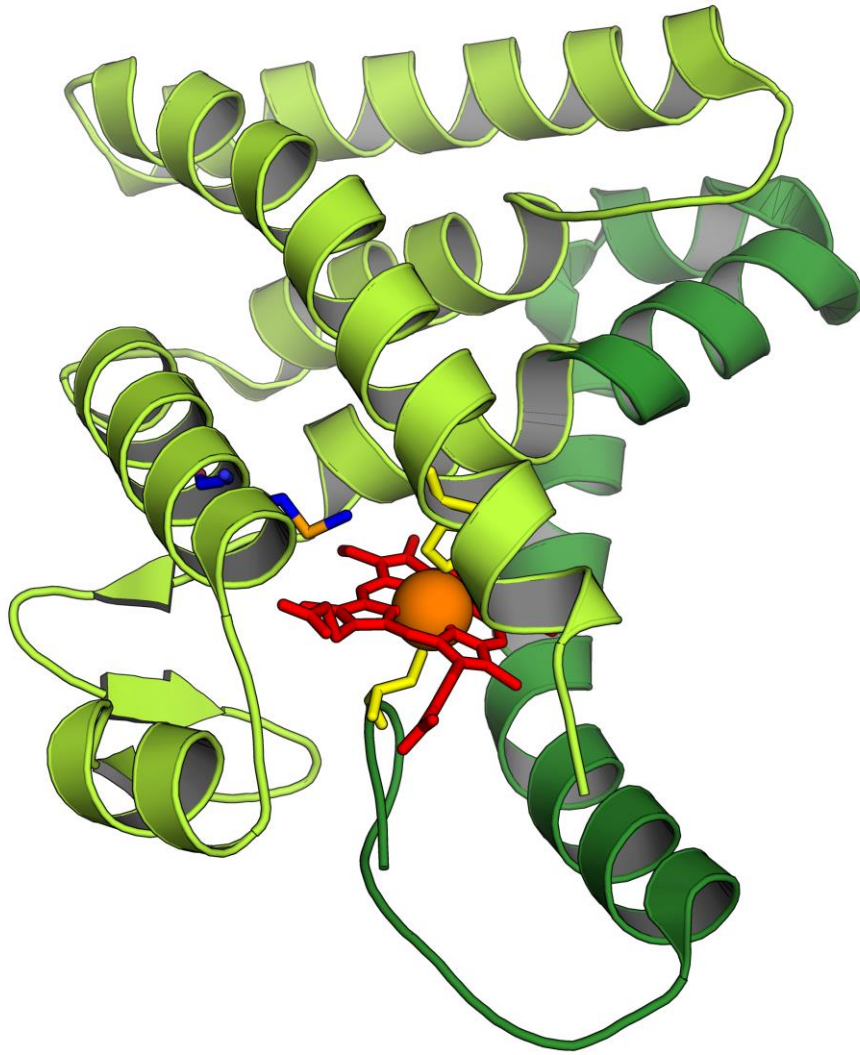
- Shesely, E.G., Maeda, N., Kim, H.S., Desai, K.M., Kregge, J.H., Laubach, V.E., Sherman, P.A., Sessa, W.C., and Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13176-13181.
- Siddhanta, U., Wu, C.Q., AbuSoud, H.M., Zhang, J.L., Ghosh, D.K., and Stuehr, D.J. (1996). Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *Journal of Biological Chemistry* 271, 7309-7312.
- Sinnett-Smith, J., Jacamo, R., Kui, R., Wang, Y.Z.M., Young, S.H., Rey, O., Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2009). Protein Kinase D Mediates Mitogenic Signaling by G(q)-coupled Receptors through Protein Kinase C-independent Regulation of Activation Loop Ser(744) and Ser(748) Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13434-13445.
- Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Hsieh, N., Jiang, X.H., and Rozengurt, E. (2004). Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by G(q)-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 16883-16893.
- Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Rey, O., and Rozengurt, E. (2007). Protein kinase D2 potentiates MEK/ERK/RSK signaling, c-Fos accumulation and DNA synthesis induced by Bombesin in Swiss 3T3 cells. *Journal of Cellular Physiology* 211, 781-790.
- Socodato, R., Santiago, F.N., Portugal, C.C., Domingues, A.F., Santiago, A.R., Relvas, J.B., Ambrosio, A.F., and Paes-de-Carvalho, R. (2012). Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors trigger neuronal nitric-oxide synthase activation to promote nerve cell death in an Src kinase-dependent fashion. *J Biol Chem* 287, 38680-38694.
- Song, J., Li, J., Qiao, J.B., Jain, S., Evers, B.M., and Chung, D.H. (2009). PKD prevents H2O2-induced apoptosis via NF-kappa B and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378, 610-614.
- Song, T., Hatano, N., Horii, M., Tokumitsu, H., Yamaguchi, F., Tokuda, M., and Watanabe, Y. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Lett* 570, 133-137.
- Southgate, K., and Newby, A.C. (1990). Serum-Induced Proliferation of Rabbit Aortic Smooth-Muscle Cells from the Contractile State Is Inhibited by 8-Br-Camp but Not 8-Br-Cgmp. *Atherosclerosis* 82, 113-123.
- Sowa, G., Liu, J., Papapetropoulos, A., Rex-Haffner, M., Hughes, T.E., and Sessa, W.C. (1999). Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem* 274, 22524-22531.
- Stafford, M.J., Watson, S.P., and Pears, C.J. (2003). PKD: a new protein kinase C-dependent pathway in platelets. *Blood* 101, 1392-1399.
- Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683.
- Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews* 81, 209-237.
- Steinert, J.R., Chernova, T., and Forsythe, I.D. (2010). Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *Neuroscientist* 16, 435-452.
- Steinert, J.R., Chernova, T., and Forsythe, I.D. (2013). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16, 435-452.
- Stokka, A.J., Mosenden, R., Ruppelt, A., Lygren, B., and Tasken, K. (2010). The adaptor protein EBP50 is important for localization of the protein kinase A-Ezrin complex in T-cells and the immunomodulating effect of cAMP. *Biochemical Journal* 425, 381-388.
- Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1994). Soluble Guanylate-Cyclase from Bovine Lung - Activation with Nitric-Oxide and Carbon-Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. *Biochemistry* 33, 5636-5640.
- Storz, P., Doppler, H., Johannes, F.J., and Toker, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem* 278, 17969-17976.
- Storz, P., Doppler, H., and Toker, A. (2004a). Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor kappa B. *Molecular Pharmacology* 66, 870-879.
- Storz, P., Doppler, H., and Toker, A. (2004b). Protein kinase C delta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappa B in oxidative stress signaling. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2614-2626.
- Storz, P., and Toker, A. (2003). Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappa B activation and survival pathway. *Embo Journal* 22, 109-120.
- Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Bredt, D.S., and Li, M. (1997). PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol* 15, 336-342.
- Stuehr, D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37, 339-359.
- Sturany, S., Van Lint, J., Gilchrist, A., Vandenheede, J.R., Adler, G., and Seufferlein, T. (2002). Mechanism of activation of protein kinase D2(PKD2) by the CCK(B)/gastrin receptor. *J Biol Chem* 277, 29431-29436.
- Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., et al. (2001). Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem* 276, 3310-3318.
- Sun, X.G., Wu, F., Datta, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2000). Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7470-7473.

- Takahashi, S., and Mendelsohn, M.E. (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278, 30821-30827.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 20, 2768-2778.
- Tennesi, L., DEmlia, D.M., and Lipton, S.A. (1997). Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neuroscience Letters* 236, 139-142.
- Tiso, M., Konas, D.W., Panda, K., Garcin, E.D., Sharma, M., Getzoff, E.D., and Stuehr, D.J. (2005). C-terminal tail residue Arg1400 enables NADPH to regulate electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 280, 39208-39219.
- Tochio, H., Zhang, Q., Mandal, P., Li, M., and Zhang, M. (1999). Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol* 6, 417-421.
- Toda, N., Ayajiki, K., and Okamura, T. (2009). Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Hypertension* 27, 1929-1940.
- Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S.S., and Levi, R. (1992). A Central-Nervous-System Action of Nitric-Oxide in Blood-Pressure Regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 262, 343-347.
- Tottrup, A., Svane, D., and Forman, A. (1991). Nitric-Oxide Mediating Nanc Inhibition in Opossum Lower Esophageal Sphincter. *American Journal of Physiology* 260, G385-G389.
- Turko, I.V., Ballard, S.A., Francis, S.H., and Corbin, J.D. (1999). Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (type 5) by sildenafil and related compounds. *Molecular Pharmacology* 56, 124-130.
- Tyryshkin, A., Gorgun, F.M., Fattah, E.A., Mazumdar, T., Pandit, L., Zeng, S.Y., and Eissa, N.T. (2010). Src Kinase-mediated Phosphorylation Stabilizes Inducible Nitric-oxide Synthase in Normal Cells and Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 285, 784-792.
- Urbich, C., Rossig, L., Kaluza, D., Potente, M., Boeckel, J.N., Knau, A., Diehl, F., Geng, J.G., Hofmann, W.K., Zeiher, A.M., et al. (2009). HDAC5 is a repressor of angiogenesis and determines the angiogenic gene expression pattern of endothelial cells. *Blood* 113, 5669-5679.
- Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8572-8576.
- van't Hof, R.J., Armour, K.J., Smith, L.M., Armour, K.E., Wei, X.Q., Liew, F.Y., and Ralston, S.H. (2000). Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7993-7998.
- Vanlint, J., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (1995). Expression and Characterization of Pkd, a Phorbol Ester and Diacylglycerol-Stimulated Serine Protein-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 1455-1461.
- VanVoorhis, B.J., Moore, K., Strijbos, P.J.L.M., Nelson, S., Baylis, S.A., Grzybicki, D., and Weiner, C.P. (1995). Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary - Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 96, 2719-2726.
- Vega, R.B., Harrison, B.C., Meadows, E., Roberts, C.R., Papst, P.J., Olson, E.N., and McKinsey, T.A. (2004). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* 24, 8374-8385.
- Venema, R.C., Ju, H., Zou, R., Ryan, J.W., and Venema, V.J. (1997). Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase - Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1276-1282.
- Venema, R.C., Venema, V.J., Ju, H., Harris, M.B., Snead, C., Jilling, T., Dimitropoulou, C., Maragoudakis, M.E., and Catravas, J.D. (2003). Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H669-678.
- Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V., and Coon, M.J. (1981). Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 256, 266-277.
- Vodovotz, Y., Russell, D., Xie, Q.W., Bogdan, C., and Nathan, C. (1995). Vesicle Membrane Association of Nitric-Oxide Synthase in Primary Mouse Macrophages. *Journal of Immunology* 154, 2914-2925.
- Waldron, R.T., Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1999a). Phosphorylation-dependent protein kinase D activation. *Electrophoresis* 20, 382-390.
- Waldron, R.T., Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1999b). The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C. *J Biol Chem* 274, 9224-9230.
- Waldron, R.T., Rey, O., Iglesias, T., Tugal, T., Cantrell, D., and Rozengurt, E. (2001). Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J Biol Chem* 276, 32606-32615.
- Waldron, R.T., Rey, O., Zhukova, E., and Rozengurt, E. (2004). Oxidative stress induces protein kinase C-mediated activation loop phosphorylation and nuclear redistribution of protein kinase D. *Journal of Biological Chemistry* 279, 27482-27493.
- Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2000). Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells - Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 275, 17114-17121.
- Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2003). Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 278, 154-163.

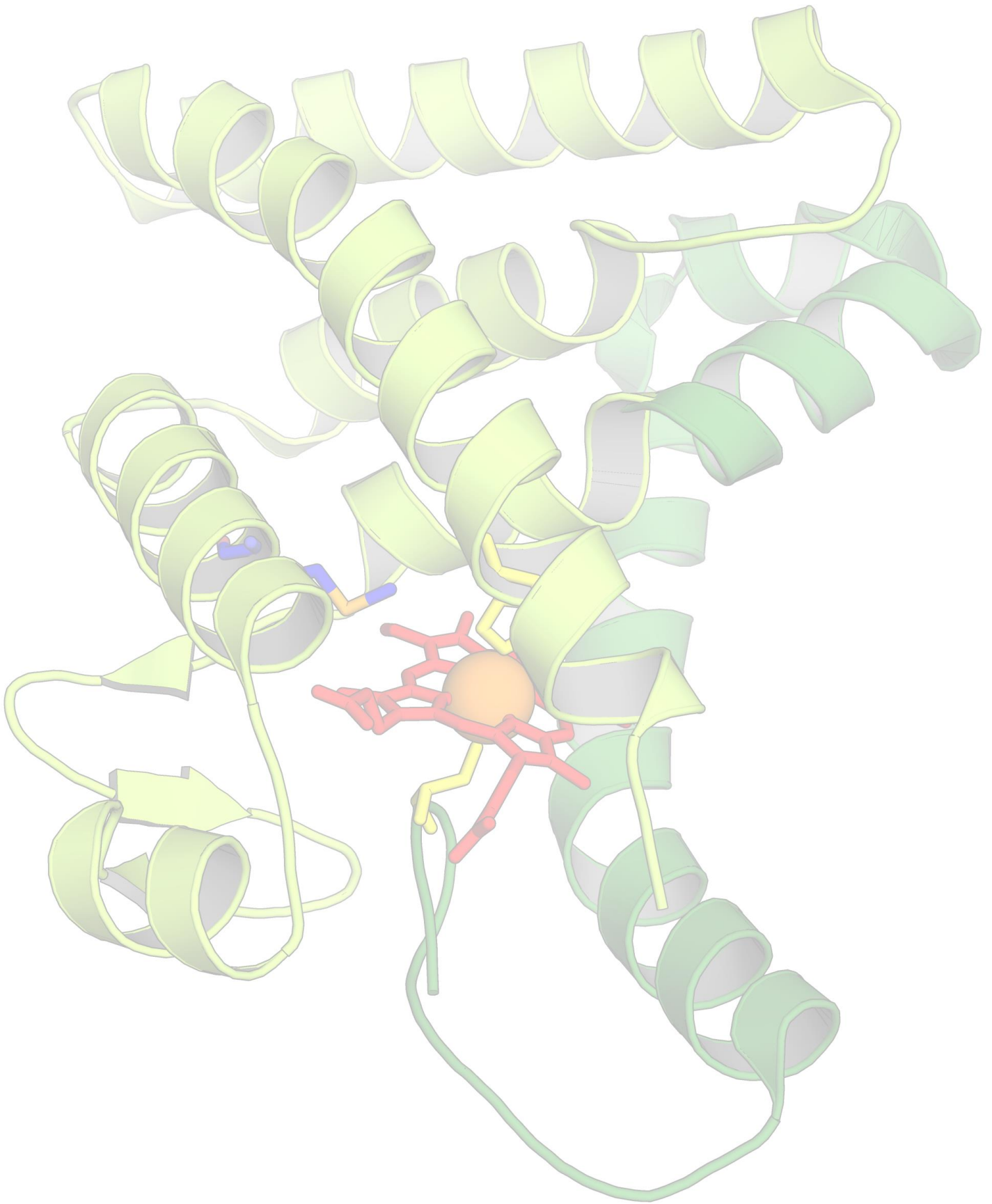
- Wang, P., Zhang, Q., Tochio, H., Fan, J.S., and Zhang, M. (2000a). Formation of a native-like beta-hairpin finger structure of a peptide from the extended PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase in aqueous solution. *Eur J Biochem* 267, 3116-3122.
- Wang, Q.M.J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 317-323.
- Wang, S.S., Li, X.M., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7738-7743.
- Wang, S.S., Yue, H.W., Derin, R., Guggino, W.B., and Li, M. (2000b). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR: A molecular mechanism to potentiate chloride channel activity. *Molecular Biology of the Cell* 11, 222a-222a.
- Wang, Y., Waldron, R.T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M.M., Rozengurt, E., and Colicelli, J. (2002). The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol* 22, 916-926.
- Weinman, E.J., Steplock, D., Wang, Y.P., and Shenolikar, S. (1995). Characterization of a Protein Cofactor That Mediates Protein-Kinase-a Regulation of the Renal Brush-Border Membrane Na⁺-H⁺ Exchanger. *Journal of Clinical Investigation* 95, 2143-2149.
- Williams, C.H., Jr., and Kamin, H. (1962). Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J Biol Chem* 237, 587-595.
- Wohlfart, P., Xu, H., Endlich, A., Habermeier, A., Closs, E.I., Hubschle, T., Mang, C., Strobel, H., Suzuki, T., Kleinert, H., *et al.* (2008). Antiatherosclerotic effects of small-molecular-weight compounds enhancing endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325, 370-379.
- Wong, C., and Jin, Z.G. (2005). Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 280, 33262-33269.
- Wood, E.R., Berger, H., Sherman, P.A., and Lapetina, E.G. (1993). Hepatocytes and Macrophages Express an Identical Cytokine Inducible Nitric-Oxide Synthase Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191, 767-774.
- Xia, C., Misra, I., Iyanagi, T., and Kim, J.J. (2009). Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 284, 30708-30717.
- Xie, Q.W., Cho, H., Kashiwabara, Y., Baum, M., Weidner, J.R., Elliston, K., Mumford, R., and Nathan, C. (1994). Carboxyl-Terminus of Inducible Nitric-Oxide Synthase - Contribution to NADPH Binding and Enzymatic-Activity. *Journal of Biological Chemistry* 269, 28500-28505.
- Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A.H., Troso, T., and Nathan, C. (1992). Cloning and Characterization of Inducible Nitric-Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science* 256, 225-228.
- Xu, W.M., Charles, I.G., and Moncada, S. (2005). Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Research* 15, 63-65.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
- Yasukochi, Y., and Masters, B.S. (1976). Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem* 251, 5337-5344.
- Yeaman, C., Ayala, M.I., Wright, J.R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W.J., *et al.* (2004). Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nature Cell Biology* 6, 106-112.
- Yeh, D.C., Duncan, J.A., Yamashita, S., and Michel, T. (1999). Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. *J Biol Chem* 274, 33148-33154.
- Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Rodriguez-Crespo, I., and Gavilanes, F. (2006). Influence of acylation of a Peptide corresponding to the amino-terminal region of endothelial nitric oxide synthase on the interaction with model membranes. *Biochemistry* 45, 1263-1270.
- Yen, D.H., Chen, L.C., Shen, Y.C., Chiu, Y.C., Ho, I.C., Lou, Y.J., Chen, I.C., and Yen, J.C. (2011). Protein kinase A-dependent neuronal nitric oxide synthase activation mediates the enhancement of baroreflex response by adrenomedullin in the nucleus tractus solitarius of rats. *J Biomed Sci* 18, 32.
- Yin, D.M., Huang, Y.H., Zhu, Y.B., and Wang, Y. (2008). Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci* 28, 8832-8843.
- Yoo, J., Chung, C., Slice, L., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2009). Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF-alpha and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297, C1576-C1587.
- Yoshida, M., and Xia, Y. (2003). Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 278, 36953-36958.
- Yuan, J.Z., Bae, D., Cantrell, D., Nel, A.E., and Rozengurt, E. (2002). Protein kinase D is a downstream target of protein kinase C theta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 444-452.
- Yuan, J.Z., Slice, L., Walsh, J.H., and Rozengurt, E. (2000). Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q). *Journal of Biological Chemistry* 275, 2157-2164.
- Yuan, J.Z., Slice, L.W., Gu, J., and Rozengurt, E. (2003). Cooperation of G(q), G(i), and G(12/13) in protein kinase D activation and phosphorylation induced by lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4882-4891.
- Yuan, J.Z., Slice, L.W., and Rozengurt, E. (2001). Activation of protein kinase D by signaling through Rho and the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(13). *Journal of Biological Chemistry* 276, 38619-38627.

- Yun, C.H.C., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C.M., Weinman, E.J., and Donowitz, M. (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3010-3015.
- Zachary, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31, 1171-1177.
- Zeiher, A.M., Fisslthaler, B., Schrayutz, B., and Busse, R. (1995). Nitric-Oxide Modulates the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Cultured Human Endothelial-Cells. *Circulation Research* 76, 980-986.
- Zhang, W., Zheng, S., Storz, P., and Min, W. (2005). Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H₂O₂ but not tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 280, 19036-19044.
- Zhang, Y., Lee, T.S., Kolb, E.M., Sun, K., Lu, X., Sladek, F.M., Kassab, G.S., Garland, T., Jr., and Shyy, J.Y. (2006). AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1281-1287.
- Zhang, Y.K., Brovkovich, V., Brovkovich, S., Tan, F.L., Lee, B.S., Sharma, T., and Skidgel, R.A. (2007). Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of ser(745). *Journal of Biological Chemistry* 282, 32453-32461.
- Zhou, L., and Zhu, D.Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20, 223-230.
- Zhukova, E., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2001a). Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 40298-40305.
- Zhukova, E., Sinnett-Smith, J., Wong, H., Chiu, T., and Rozengurt, E. (2001b). CCKB/gastrin receptor mediates synergistic stimulation of DNA synthesis and cyclin D1, D3, and E expression in Swiss 3T3 cells. *Journal of Cellular Physiology* 189, 291-305.
- Ziegler, S., Eiseler, T., Scholz, R.P., Beck, A., Link, G., and Hausser, A. (2011). A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Mol Biol Cell* 22, 570-580.
- Zugaza, J.L., Waldron, R.T., SinnettSmith, J., and Rozengurt, E. (1997). Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23952-23960.

BLOQUE II



Caracterización del receptor nuclear E75, un sensor de óxido nítrico



INTRODUCCIÓN

1. Los receptores nucleares: estructura y función.

Los receptores nucleares constituyen la superfamilia más amplia de factores de transcripción. Se trata de polipéptidos regulados por ligando capaces de controlar una gran variedad de procesos biológicos, como el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo y función del sistema reproductivo y los ritmos circadianos. En humanos existen al menos 48 miembros de la superfamilia de receptores nucleares, en *Drosophila* aproximadamente la mitad y en nematodos 6 veces más. En humanos, la mitad de ellos tienen ligandos identificados en los que los receptores claramente funcionan como factores de transcripción activados por pequeñas moléculas hidrofóbicas, como hormonas esteroides, ácidos grasos, derivados de vitaminas liposolubles y metabolitos de la dieta. Estas moléculas funcionan uniéndose dentro del dominio de unión a ligando (LBD) presente en el receptor nuclear. El resto de los receptores nucleares humanos y casi todos los de *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* son receptores huérfanos, ya que no tienen un ligando identificado (Burris, 2008). Así, en función del tipo de ligando que unen, se han definido tres clases de receptores nucleares (Chawla et al., 2001; Evans, 1988): receptores endocrinos que unen ligandos como hormonas esteroides y vitaminas liposolubles con alta afinidad, receptores lipídicos que generalmente unen lípidos de la dieta, bioactivos o exógenos con baja afinidad y receptores nucleares cuyo ligando se desconoce y que se clasifican como receptores huérfanos.

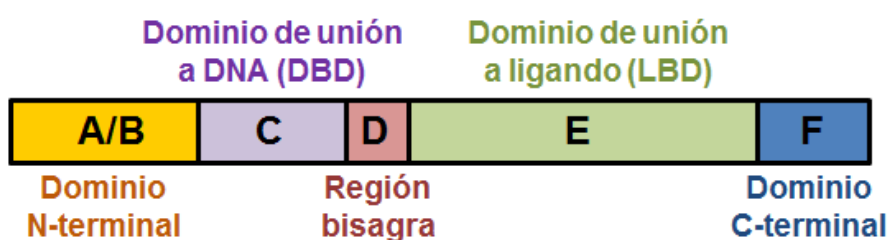


Figura 1. Organización estructural de los receptores nucleares. Los receptores nucleares presentan una arquitectura en dominios conservada, con un dominio N-terminal de longitud y secuencia variables (región A/B), un dominio de unión a DNA (DBD) o región C, una región bisagra flexible (región D) y un dominio de unión a ligando (LBD o región E) C-terminal estructuralmente conservado, en algunos casos seguido de una región F.

Los receptores nucleares presentan una arquitectura en dominios común (Figura 1), con un dominio N-terminal de longitud y secuencia variables que tiene una función de transactivación constitutivamente activa (región A/B), un dominio de unión a DNA (DBD) altamente conservado que contiene dos dedos de zinc (región C), una región bisagra flexible (región D) y un dominio de unión a ligando (LBD o región E) C-terminal estructuralmente conservado, implicado no sólo en la unión del ligando sino también en la dimerización y unión de proteínas correguladoras (ya sean correpresoras o coactivadoras). Algunos de ellos también contienen una región F, cuya función no es del todo clara (Renaud y Moras, 2000).

La mayoría de los receptores nucleares contienen dos regiones distintas implicadas en la activación de la transcripción: una región de activación de la función 1 (AF-1) independiente de ligando que reside

en el extremo N-terminal y una región de activación de la función 2 (AF-2) dependiente de ligando que reside en el dominio de unión a ligando (Mangelsdorf y Evans, 1995). Mientras que diferentes subregiones del LBD contribuyen a AF-2, la integridad de una hélice α anfipática en el extremo C-terminal del LBD (que corresponde a la hélice α 12 en la estructura conservada del LBD de los receptores nucleares (Wurtz et al., 1996)) resulta ser indispensable para la activación dependiente de ligando. A modo de ejemplo, una hélice α anfipática similar, caracterizada por el motivo conservado $\Phi\Phi X E \Phi\Phi$ (siendo Φ un aminoácido hidrofóbico y X un aminoácido no conservado) (Mangelsdorf y Evans, 1995), está presente en el extremo C-terminal del dominio de unión a ligando del receptor nuclear HR3A (*Hormone receptor 3 isoform A*) de *Bombyx mori* (LYKELF; aa 474–479 en (Eystathioy et al., 2001)).

En general, los receptores nucleares de hormonas esteroides se translocan del citoplasma al núcleo de forma dependiente de la hormona para activar la transcripción de genes (revisado en (Hager et al., 2000)). Otros receptores nucleares, como por ejemplo los RXRs (*Retinoid X receptors*) y RARs (*Retinoic acid receptors*), residen en el núcleo y el heterodímero RAR/RXR de forma constitutiva se une al elemento de respuesta a hormonas en el DNA, activando o reprimiendo la transcripción en presencia o ausencia de ligando, respectivamente (revisado en (Glass y Rosenfeld, 2000)). Sin embargo, estudios posteriores han difuminado estas diferencias. Por ejemplo, si bien en muchos tipos celulares los RXRs y los receptores nucleares con los que heterodimerizan como los RARs se localizan en el núcleo, en algunos tipos celulares, en ciertos estadios del desarrollo o en determinados entornos celulares, se han localizado en el citoplasma (Cao et al., 2004).

La unión de pequeñas moléculas al LBD de los receptores nucleares, modula su asociación con motivos específicos de DNA dentro del genoma cerca de sus genes diana, regulando de esta forma su tasa de transcripción de forma dependiente de ligando. La mayoría se unen al DNA como dímeros, ya sea como homodímeros (como es el caso de los receptores de esteroides) o heterodímeros con otro miembro de la superfamilia de los receptores nucleares (Mangelsdorf y Evans, 1995; Mangelsdorf et al., 1995). Un número limitado de ellos tiene la capacidad de unirse al DNA como monómeros. La unión del ligando (o del agonista) induce un cambio conformacional dentro del LBD que permite la creación de una superficie única que es reconocida por proteínas coactivadoras (Savkur y Burris, 2004). Así, el LBD actúa como interruptor molecular, que sufre cambios conformacionales tras la unión del ligando, cambios que en definitiva afectan a la localización subcelular, dimerización, unión al DNA, unión de proteínas coactivadoras y/o a la actividad transcripcional (Glass y Rosenfeld, 2000). Una vez que las proteínas coactivadoras son reclutadas al LBD del receptor nuclear y de esta manera a la región promotora del gen, la tasa de síntesis de mRNA aumenta debido a la estabilización del complejo de preiniciación y a la modificación de la estructura de la cromatina (Lonard y O'Malley, 2007). Si bien la mayoría de los receptores nucleares se comportan de esta forma, otros pueden poseer actividad constitutiva debido a una unión constante con proteínas coactivadoras, o por el contrario desempeñan silenciamiento

transcripcional (represión activa) de la expresión de ciertos genes debido a una unión constante con proteínas correpresoras que median el reclutamiento de histonas deacetilasas (Giguere, 1999).

El hecho de que los receptores nucleares desempeñen papeles clave en desarrollo, metabolismo, reproducción y enfermedad, sumado a que la naturaleza de sus ligandos les convierte en excelentes dianas terapéuticas, ha generado un gran interés por tratar de identificar ligandos de los receptores nucleares y en particular de los receptores huérfanos.

2. Señalización inducida por ecdisona y el receptor nuclear E75 en insectos.

La vía de señalización inducida por ecdisona, es un componente esencial del eje endocrino que controla el desarrollo y la reproducción en artrópodos. Numerosos receptores nucleares, factores de transcripción, coactivadores y correpresores coordinan esta vía para transmitir la señalización iniciada por esta hormona (Smagghe, 2009).

Uno de los pocos receptores nucleares con ligando conocido descrito en *Drosophila* es el receptor de ecdisona (EcR). Las primeras etapas de la metamorfosis de *Drosophila* son iniciadas y están controladas por dos pulsos sucesivos de la hormona esteroide 20-hidroxiecdisona (ecdisona). Tras la unión de ecdisona, el EcR heterodimeriza con un segundo receptor nuclear, ultraespiráculo (USP), activando así una cascada de señalización en la que están implicados varios genes (Thummel, 1995) que, en definitiva, regulan numerosos procesos fisiológicos entre ellos la metamorfosis (Bialecki et al., 2002; Thummel, 1996), embriogénesis (Bownes et al., 1988), crecimiento (Bownes et al., 1988), diferenciación (Laufer et al., 2002), el desarrollo de la cámara del huevo (Buszczak et al., 1999), muda (Ampleford, 1985), diapausa, reproducción y comportamiento (Richard et al., 1998). El heterodímero EcR/USP recluta corre reguladores, los cuales modifican histonas, lo que da lugar a la alteración de la estructura de la cromatina y facilita el acceso de los factores de transcripción y se activa así la transcripción de los genes *DHR3* (que codifica para el receptor nuclear DHR3, *Drosophila hormone receptor 3*) y de la isoforma del gen *Eip75B*, *E75A* (Bialecki et al., 2002; Koelle et al., 1991; Lam et al., 1997; Lan et al., 1997; White et al., 1997). DHR3 promueve su propia expresión continuada así como la de la variante de procesamiento de *Eip75B*, *E75B* y la del gen β Ftz-F1, que codifica para otro receptor nuclear. Como producto temprano en respuesta a esta hormona, se cree que el receptor nuclear E75 (*Ecdysone-induced protein 75*) regula un conjunto de procesos del desarrollo iniciados por señales de ecdisona. También parece que E75 participa en un nivel anterior de esta cascada de señalización ya que se requiere para la síntesis de ecdisona (Bialecki et al., 2002). β Ftz-F1 (*Beta fushi tarazu-factor 1*) activa la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ecdisona (Broadus et al., 1999; Lavorgna et al., 1993; Woodard et al., 1994), dando lugar a otra ronda de producción de la hormona.

Así pues, uno de los papeles mejor caracterizados de E75 y HR3 (*Hormone receptor 3*) *in vivo* es el de formar parte de la jerarquía transcripcional de receptores nucleares que controla y responde a la

producción de ecdisona, la hormona inductora de la metamorfosis. En insectos mutantes para E75 en la línea germinal se observa una parada en la oogénesis media (Buszczak et al., 1999), mientras que las mutaciones cigóticas resultan ser letales embrionarias, con defectos en el intestino y en la metamorfosis.

En otros insectos también se expresan ortólogos de E75 y lo hacen de forma activa durante el desarrollo larvario, la pupación y la oogénesis (Erezyilmaz et al., 2009; Jindra et al., 1994; Palli et al., 1997; Palli et al., 1995; Siauxsat et al., 2004; Swevers et al., 2002a; Zhang et al., 2004). Además se han descrito ortólogos de E75 en crustáceos como la gamba *Metapenaeus ensis*, en la que también se expresa durante la muda (Chan, 1998), o en miembros del género *Daphnia* (Hannas y LeBlanc, 2010; Hannas et al., 2010) entre otros.

En insectos, el producto del gen temprano inducido *Eip75B*, el receptor nuclear E75, se ha implicado genéticamente en la represión de varios genes de la cascada desencadenada por ecdisona (Hiruma y Riddiford, 2004) y está bien establecido que E75 también actúa como represor en ensayos de transfección transitoria (Reinking et al., 2005; Swevers et al., 2002b; White et al., 1997). Se sabe que la heterodimerización de E75 con el receptor nuclear HR3 bloquea la capacidad activadora transcripcional del segundo (Figura 2) (Reinking et al., 2005). Es interesante el hecho de que, el receptor nuclear E75 de *Drosophila melanogaster* y más concretamente su LBD, es una hemoproteína que une gases diatómicos como •NO y CO (Reinking et al., 2005). Así, E75 es el primer receptor nuclear descrito que pertenece a la clase de las hemoproteínas. De hecho, cuando la proteína E75 completa de *D. melanogaster* se aísla de pupas de insecto, se purifica como hemoproteína en estado férrico con hemo unido y su dominio LBD expresado de forma recombinante, bien en bacterias o en células infectadas por baculovirus, también se purifica como hemoproteína (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005).

Desde un punto de vista funcional, el átomo de hierro del grupo hemo de E75 de *D. melanogaster* puede oxidarse o reducirse de forma reversible, lo que afecta a la capacidad de E75 para heterodimerizar con HR3 así como para unir los gases diatómicos •NO y CO. La coordinación de gases diatómicos con el grupo hemo de E75 induce un cambio conformacional que impide su interacción con el receptor nuclear DHR3, concretamente con un péptido derivado de la región AF-2 de DHR3, de modo que DHR3 queda libre para llevar a cabo su actividad transcripcional, que estaba bloqueada por la acción represora de E75 (Reinking et al., 2005). Así pues, la heterodimerización entre E75 y DHR3 está modulada tanto por el estado redox del hemo, ya que la reducción del hemo de E75 es necesaria para que pueda unir DHR3 y reprimir la transcripción, así como por la unión de los gases •NO y CO. La unión de •NO a E75 de *D. melanogaster* desplaza los ligandos axiales Cys e His que estaban coordinados con el hierro del hemo en ausencia del gas, dando lugar a un complejo Fe(II)NO pentacoordinado, lo que justifica la observación de que el •NO funciona como antagonista de la actividad represora de E75 (Caceres et al., 2011; Johnston et al., 2011; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). En *Drosophila*, el •NO producido por la óxido nítrico sintasa cancela la represión que E75 lleva a cabo sobre DHR3 en la glándula protorácica (Caceres

et al., 2011). Es interesante resaltar el hecho de que el principal lugar de producción de ecdisona en las larvas de *Drosophila* es la glándula protorácica, siendo también ese órgano donde se producen los mayores niveles de expresión de óxido nítrico sintasa (Wildemann y Bicker, 1999).

En último lugar, la unión de CO al LBD de E75 de *D. melanogaster* purificado da lugar a un complejo Fe(II)CO hexacoordinado con un sexto ligando neutro (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009), que estabiliza la proteína, e impide su interacción con un péptido derivado de DHR3 (Reinking et al., 2005) aunque no se sabe si, *in vivo*, el LBD de E75 de *D. melanogaster* en estado ferroso con CO unido tampoco puede unirse con otros receptores nucleares como DHR3 o con el correpresor SMRTER (*NCoR/SMRT-related molecule in Drosophila*).

Todos estos resultados sugieren que E75 pueda funcionar como sensor intracelular de hemo (si bien esta propiedad será discutida posteriormente), sensor redox y sensor de gases (Reinking et al., 2005).

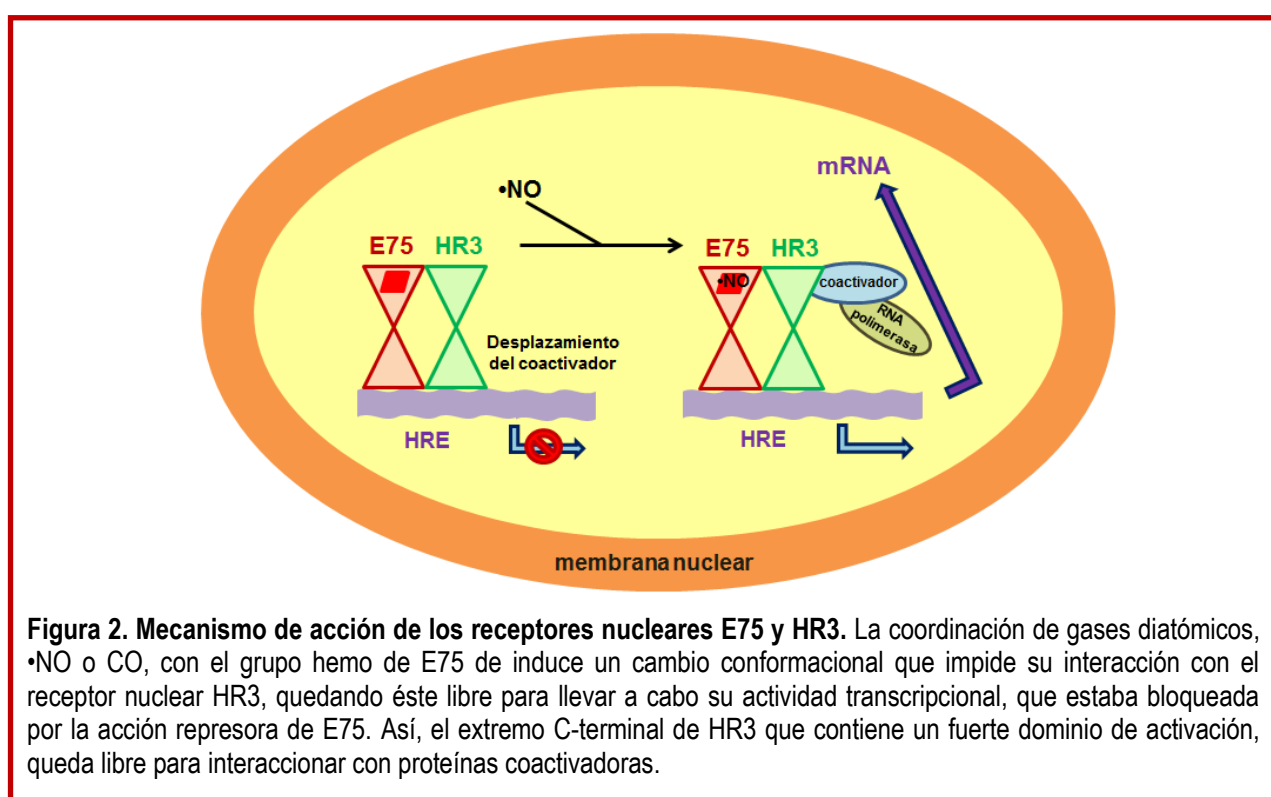


Figura 2. Mecanismo de acción de los receptores nucleares E75 y HR3. La coordinación de gases diatómicos, $\bullet\text{NO}$ o CO, con el grupo hemo de E75 de induce un cambio conformacional que impide su interacción con el receptor nuclear HR3, quedando éste libre para llevar a cabo su actividad transcripcional, que estaba bloqueada por la acción represora de E75. Así, el extremo C-terminal de HR3 que contiene un fuerte dominio de activación, queda libre para interactuar con proteínas coactivadoras.

2.1. Los receptores nucleares Rev-erbs, los ortólogos de E75 en mamíferos.

Dentro de los LBDs de mamíferos, los ortólogos más cercanos a los E75 de insectos son los receptores nucleares Rev-erba (NR1D1) y Rev-erb β (NR1D2), dos proteínas relacionadas que generalmente actúan como represores transcripcionales ya sea por sí mismos o reclutando proteínas correpresoras. Los Rev-erbs desempeñan un papel clave en la regulación de los ritmos circadianos, en el metabolismo de lípidos y de glucosa y en enfermedades como la diabetes, aterosclerosis, inflamación y cáncer (Harding y Lazar, 1995; Pardee et al., 2009). En la mayoría de los casos, los receptores nucleares Rev-erbs están situados en el núcleo y se unen como monómeros a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta Rev o como dímeros a un elemento de respuesta Rev de

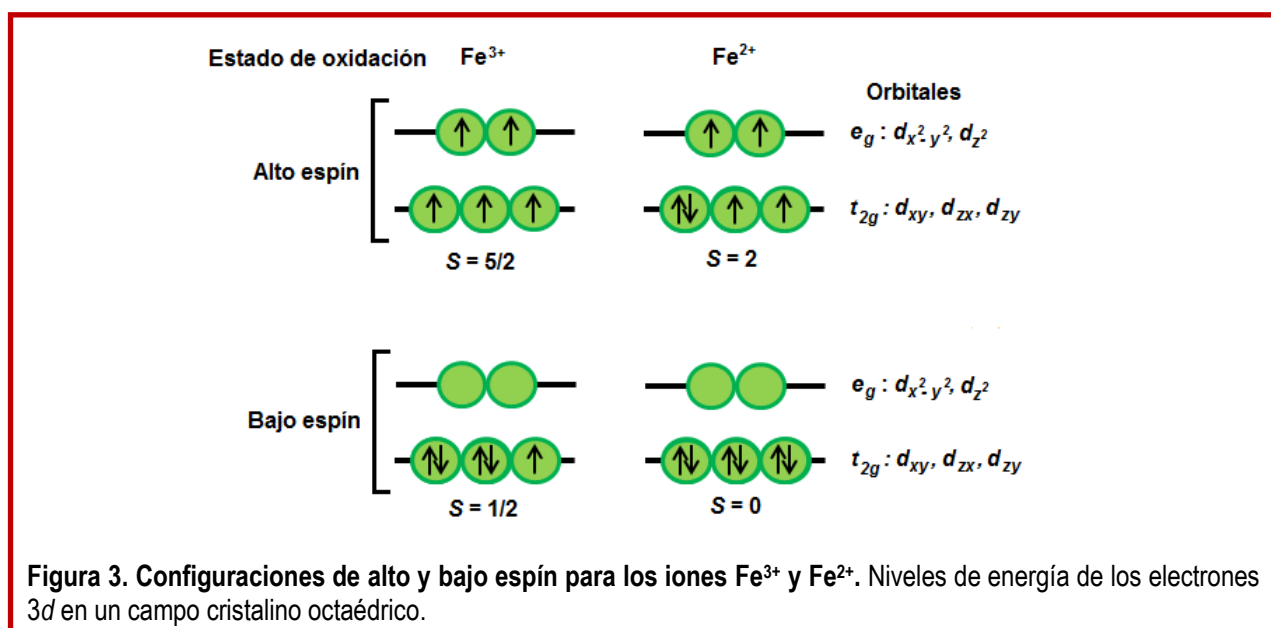
repetición directa, RevDR-2 (Duez y Staels, 2008). Como en el caso de los LBDs de E75 de insectos, Rev-erba y Rev-erb β unen hemo y la unión reversible de hemo parece que regula la actividad transcripcional de Rev-erb β (Pardee et al., 2009; Raghuram et al., 2007; Yin et al., 2007). Recientemente, se ha podido dilucidar la estructura a nivel atómico tanto de Rev-erba (Phelan et al., 2010) como de Rev-erb β (Pardee et al., 2009). Mientras que Rev-erb β silvestre puede reprimir la transcripción de genes diana, su mutante puntual His602Phe, el cual no puede unir hemo, no desempeña esta actividad represora transcripcional (Raghuram et al., 2007). Dado que los niveles celulares de hemo varían durante el ciclo circadiano, se considera que Rev-erba y Rev-erb β enlazan el ciclo circadiano y el metabolismo (Ramakrishnan y Muscat, 2006). En un principio, se propuso que la actividad de Rev-erba y Rev-erb β no se veía afectada por la reducción del hierro del hemo con ditionito sódico o por la adición de donadores de \bullet NO (Raghuram et al., 2007), si bien resultados recientes sugieren que Rev-erba y Rev-erb β recombinantes pueden unir \bullet NO y CO (Gupta y Ragsdale, 2011; Marvin et al., 2009; Pardee et al., 2009). De esta forma, Rev-erb β saturado de hemo puede unir \bullet NO, regulando así la unión a correpresores (Pardee et al., 2009).

3. El grupo hemo.

El grupo hemo está formado por un átomo de hierro y un anillo de porfirina y constituye uno de los grupos prostéticos más versátiles empleados por la naturaleza para ensamblar una gran variedad de proteínas transportadoras de ligando, proteínas implicadas en la transferencia de electrones, enzimas y receptores. La flexibilidad proporcionada por los tres estados de oxidación del hierro biológicamente accesibles, la modulación de estos estados y sus propiedades químicas determinadas por los cuatro ligandos nitrógeno de la porfirina más uno o dos ligandos axiales y la interacción del sistema π de la porfirina con los orbitales d del hierro, posibilitan la rica química asociada con el grupo hemo (Colas y Ortiz de Montellano, 2003).

La porfirina en cada uno de los tipos de hemos naturales es un anillo compuesto por cuatro ciclos pirrólicos modificados interconectados por sus átomos de carbono α mediante puentes de metino ($-\text{CH}=\text{}$). Cuando se encuentra en estado de ionización menos dos, las porfirinas pueden coordinar un metal de transición, un átomo de hierro en el caso de las hemoproteínas, que se coloca aproximadamente en el centro del anillo para formar una metaloporfirina. El átomo de hierro no está exactamente en el centro del plano del hemo y el grado en el que el átomo de hierro se sitúa fuera del plano del hemo depende de la naturaleza de los ligandos axiales así como del estado de oxidación del metal (Smith y Williams, 1970). El anillo de porfirina es altamente conjugado, lo cual le impone la forma aproximadamente plana que se encuentra en la mayor parte de las proteínas. Así, en el grupo hemo, el hierro se encuentra coordinado por cuatro átomos de nitrógeno pertenecientes a cada uno de los anillos de pirrol, que configuran un entorno aproximadamente plano cuadrado.

El átomo de hierro del hemo se puede encontrar en dos estados de oxidación Fe^{2+} o Fe^{3+} . En estos estados de oxidación, como ocurre de forma general en los metales de transición del tercer periodo, el hierro tiene vacíos el orbital $4s$, los orbitales $4p$ y varios orbitales $3d$. Estos orbitales quedan disponibles para formar enlaces coordinados con átomos o moléculas dadores de electrones que, como se ha dicho, se disponen típicamente en los vértices de un octaedro en cuyo centro se encuentra el ion de hierro (Moore y Pettigrew, 1990). El ion Fe^{3+} posee cinco electrones en orbitales $3d$. Si el efecto de repulsión interelectrónica es mayor que el debido a la interacción con el entorno, se disponen tres electrones en los orbitales t_{2g} y dos electrones en los orbitales e_g , todos ellos con espín paralelo (Figura 3). En este caso, el espín total es $S = 5/2$ (configuración de alto espín). El ion Fe^{3+} en configuración de bajo espín aparece en la situación opuesta. En tal caso, todos los electrones se disponen en orbitales t_{2g} quedando únicamente un electrón desapareado. El espín total será $S = 1/2$. De igual manera, para el ion Fe^{2+} (seis electrones) se encuentran dos configuraciones, de bajo espín ($S = 0$) o de alto espín ($S = 2$). El cambio en el estado de espín altera el tamaño del hierro y su desplazamiento del plano del hemo, lo que provoca de forma directa las frecuencias vibracionales de los enlaces del anillo de porfirina (Wilks, 2002).



Una porfirina puede tener enlazadas una gran variedad de cadenas laterales, que se denominan sustituyentes, de modo que la identidad de cada tipo de hemo se distingue por los sustituyentes β -pirrólicos periféricos (Figura 4). El más común es el hemo *b*, que tiene un anillo de protoporfirina IX y su estructura fue demostrada sintéticamente por Hans Fischer (Fischer y Zeile, 1929). El hemo *b* presenta como sustituyentes grupos metilo en las posiciones 1, 3, 5 y 8, grupos vinilo en las posiciones 2 y 4 y propionatos en las posiciones 6 y 7 del macrociclo. *In vivo*, la enzima ferroquelatasa lleva a cabo la incorporación del átomo de Fe(II) sobre esta base de protoporfirina IX (Sellers et al., 2001; Wu et al., 2001). Además, el hemo *b* sirve de estructura a partir de la cual se derivan biosintéticamente los hemos *a* y *c* (Brown et al., 2002; Mogi et al., 1994; O'Brian y Thony-Meyer, 2002), que constituyen los principales

tipos de hemo. El hemo *b* se encuentra en citocromos tipo *b*, globinas, citocromos P450, NOSs y proteínas sensoras de hemo. La cadena polipeptídica une el grupo hemo mediante la combinación de la coordinación con las posiciones axiales del hierro que están disponibles, interacciones hidrofóbicas con el macrociclo del hemo e interacciones polares con los ácidos propiónicos (Breslow y Koehler, 1965; Breslow et al., 1967; Hargrove et al., 1996a; Hargrove y Olson, 1996; Hargrove et al., 1996b), que se describirán a continuación de forma más detallada.

El hemo *c* es estructuralmente similar al hemo *b* salvo por el hecho de que el hemo se une covalentemente a la proteína a través de enlaces tioéter entre los dos grupos vinilo del hemo y las cadenas laterales de dos residuos de cisteína (Bushnell et al., 1990; Moore y Pettigrew, 1990). Los citocromos *c* típicamente contienen una secuencia C-X-X-C-H de la que dos cisteínas se unen covalentemente al macrociclo de la porfirina y la histidina constituye uno de los ligandos axiales del hierro del hemo. Este hemo *c*, covalentemente unido, se encuentra en los citocromos *c* así como en los citocromos *f* (Martinez et al., 1996).

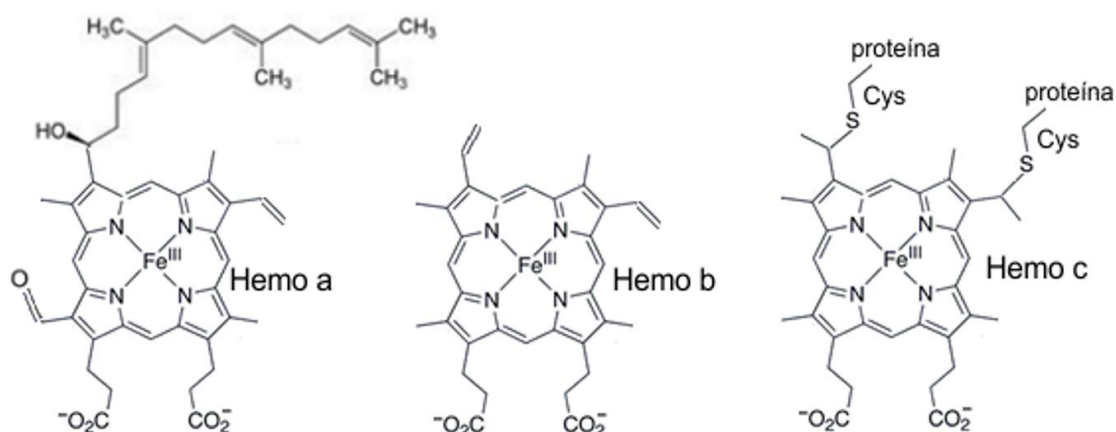


Figura 4. Estructura de los tres principales tipos de hemo encontrados en células eucariotas.

El hemo *a* se biosintetiza a partir del hemo *b* mediante la conversión del grupo vinilo en posición 2 en una cadena lateral hidroxietilfarnesil, rindiendo hemo *o*, seguido de la oxidación del metilo en posición 8 dando un grupo formil (Mogi et al., 1994). Este hemo *a* se encuentra en oxidasas terminales como la citocromo *c* oxidasa de mamíferos.

Además de estos tipos de hemos mayoritarios, en la naturaleza se han identificado otros hemos derivados del hemo *b*, algunos de los cuales se unen covalentemente a la cadena polipeptídica mediante enlaces diferentes a los descritos para el hemo *c*, que serán comentados más adelante.

3.1. La coordinación del hierro.

En las hemoproteínas, el hierro del grupo hemo aparece, además, coordinado a uno o dos ligandos axiales en dirección perpendicular al anillo de porfirina. Estos ligandos provienen de residuos de la proteína o de átomos o moléculas exógenos (H₂O, O₂, CO, •NO...). De este modo, el entorno del hierro

es aproximadamente octaédrico. Entre las hemoproteínas de estructura conocida, la esfera de coordinación primaria del hierro está dominada por la histidina que posee en el extremo de su cadena lateral un anillo de imidazol, es decir, la histidina es el ligando axial más frecuente en hemoproteínas. En concreto, el número de coordinación y el ligando más frecuentemente observado en la naturaleza es un grupo hemo pentacoordinado siendo el ligando axial un residuo de histidina, como es el caso de la mioglobina y la hemoglobina. El segundo motivo de coordinación más frecuente, es hexacoordinado bis-histidina, que se encuentra por ejemplo en el citocromo *b₅* (Durley y Mathews, 1996). Entre las hemoproteínas hexacoordinadas, el segundo motivo de coordinación más frecuente es His y Met, como en el citocromo *c* de Clase I (Dickerson et al., 1971); la metionina se coordina al hierro a través del átomo de azufre. La hexacoordinación con histidina y otro aminoácido diferente a los ya comentados es menos frecuente, si bien y a modo de ejemplo, se ha descrito la hexacoordinación His/Tyr en el citocromo *f* (Martínez et al., 1996), His/Pro en *RrCooA* (*CO activator protein* de *Rhodospirillum rubrum*) en estado reducido (Lanzilotta et al., 2000), His/Lys en citocromo *c* nitrato reductasa (Einsle et al., 1999) o His/Asn en la hemoproteína SHP (*Sphaeroides heme protein*) en estado férrico (Leys et al., 2000) de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* que tiene este citocromo *c* poco común. Otros ejemplos de motivos de hexacoordinación son bis-metionina (en la bacterioferritina (Andrews et al., 1992)) y acuosulfido (en la sulfato reductasa (Crane et al., 1995)). En cuanto a las hemoproteínas pentacoordinadas prevalece la coordinación con histidina, si bien también se ha descrito la coordinación con cisteína (tiolato) en los citocromos P450 (Poulos et al., 1987) y en las NOSs (Kotsonis et al., 2001) y la coordinación con tirosina fenóxido en la catalasa (Vainshtein et al., 1986).

El entorno de coordinación del hierro en las hemoproteínas no debe ser estático. Los grupos hemo con hierro pentacoordinado ofrecen un sitio libre para la unión del sustrato, como es el caso de proteínas transportadoras de oxígeno o proteínas sensoras. La unión del sustrato puede desplazar ligandos unidos débilmente, por ejemplo la molécula de agua, en proteínas con hemo hexacoordinado, tal y como se observa en el citocromo P450cam (Ferguson-Miller y Babcock, 1996). Además se ha descrito que proteínas con hemo hexacoordinado cambian los ligandos coordinados con el hierro en función del estado de oxidación del metal. Estos cambios de ligando controlan el evento catalítico de transferencia de electrones y conducen a una marcada histéresis en las medidas electroquímicas (Williams et al., 1997).

Si bien los ligandos axiales del hierro del hemo establecen la coordinación básica, la interacción con aminoácidos más allá de la esfera de coordinación primaria es crucial para modular las propiedades químicas del hemo, lo que le permite desempeñar una gran variedad de funciones bioquímicas. Los aminoácidos hidrofóbicos predominan en la interfase hemo-proteína. Los bolsillos en los que se une el hemo están compuestos principalmente por aminoácidos alifáticos hidrofóbicos (Leu, Ile, Met, Val, Ala), tal y como era de esperar debido a su localización en el interior de *cores* hidrofóbicos. Además, la

mayoría de las hemoproteínas contienen al menos un residuo aromático (Phe, Tyr, Trp, o His debido a su anillo imidazol) que interacciona con el macrociclo del hemo (Karmirantzou y Thornton, 1998). Estos aminoácidos aromáticos estabilizan el macrociclo del hemo a través de interacciones del tipo apilamiento π (que aluden a la disposición espacial de los anillos aromáticos) (Liu et al., 1999).

Los aminoácidos polares también contribuyen a la especificidad del bolsillo de unión del hemo al proporcionar enlaces de hidrógeno donadores/aceptores críticos y modular la polaridad del sitio de unión del hemo. También se han observado interacciones electrostáticas en los grupos propionato del hemo que a menudo establecen puentes salinos con residuos de arginina. Además, cadenas laterales de aminoácidos locales establecen la polaridad del microentorno del hemo. La polaridad del entorno local del hemo oscila desde apolar (citocromos P450) a relativamente polar (peroxidasas), lo que ayuda a controlar la química del hemo. Mientras que las interacciones polares son críticas para modular las propiedades químicas del hemo, las interacciones hidrofóbicas lo son más en términos de energías de unión que las interacciones electrostáticas de los propionatos (Hayashi et al., 1995).

3.2. Modificaciones del grupo hemo: unión covalente a la cadena polipeptídica.

Los mismos factores que contribuyen a la versatilidad del grupo hemo lo hacen susceptible de sufrir modificaciones autocatalíticas. Las transformaciones autocatalíticas del grupo hemo en hemoproteínas pueden subdividirse en dos clases: procesos anormales o patológicos que dan lugar a modificaciones no fisiológicas y/o a degradación del hemo, y procesos que han evolucionado como parte de la función natural de la proteína catalítica en cuestión. Tres ejemplos que ilustran esta segunda categoría de modificaciones autocatalíticas fisiológicas serían, (a) la conversión de hemo a biliverdina, hierro ferroso y CO por la enzima hemo-oxigenasa (HO), en la que el hemo tiene función de grupo prostético y sustrato (Auclair y Ortiz de Montellano, 2000; Ortiz de Montellano y Wilks, 2000), (b) la doble o triple unión covalente del hemo a la cadena polipeptídica que tiene lugar en las peroxidasas de mamífero (DePillis et al., 1997; Fiedler et al., 2000; Oxvig et al., 1999; Rae y Goff, 1998) y (c) una única unión covalente del hemo a la proteína como ocurre en la mayoría de los miembros de la familia CYP4 de las enzimas citocromo P450 (Henne et al., 2001; Hoch y de Montellano, 2001). Estas modificaciones son diferentes a las que conllevan la unión del grupo hemo a la proteína, como en el citocromo *c*, proceso que requiere la participación catalítica de otras proteínas (Barker y Ferguson, 1999), por lo que se trata de hemos derivados del hemo *b*, que se unen covalentemente a la cadena polipeptídica mediante enlaces diferentes a los descritos para el hemo *c*.

En la familia CYP4 de los citocromos P450, concretamente en las proteínas CYP4A, CYP4B y CYP4F, se ha descrito la unión covalente entre el grupo metilo en posición 5 del hemo y la cadena lateral de un residuo de Glu situado en la hélice I vía un enlace éster (Colas y Ortiz de Montellano, 2003; Henne et al., 2001; LeBrun et al., 2002a; LeBrun et al., 2002b; Zheng et al., 2003). En el caso de la

lactoperoxidasa y eosinófilo peroxidasa, las cadenas laterales de un Glu y un Asp forman enlaces éster con los grupos metilo 1- y 5- del hemo (Colas et al., 2002), respectivamente, mientras que en la mieloperoxidasa, se pueden encontrar dos tipos de enlaces, dos enlaces éster entre las cadenas laterales de un Glu y Asp y los grupos metilo en posición 1- y 5- del hemo, respectivamente y un tercer enlace vinil-sulfonio entre el azufre de un residuo de metionina y el carbono β - del grupo vinilo en posición 2 del hemo (Fiedler et al., 2000) (Figura 5). En la citocromo c peroxidasa y en la ascorbato peroxidasa, se han descrito enlaces covalentes entre la cadena lateral de un Trp y uno de los grupos vinilo del hemo (Pipirou et al., 2007; Pipirou et al., 2009).

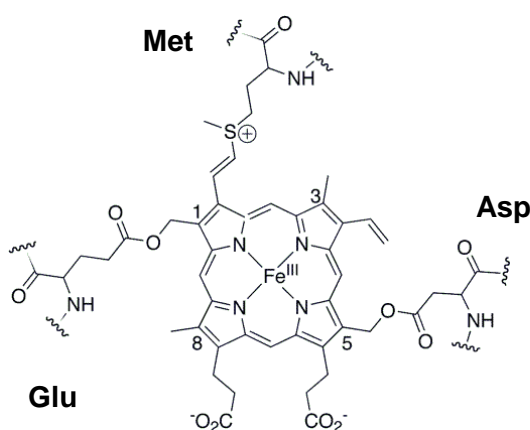


Figura 5. Unión covalente del hemo en peroxidosas de mamíferos. Los enlaces éster entre las cadenas laterales de un Glu y un Asp y los grupos metilo en posición 1- y 5- del hemo, respectivamente, están presentes en la lactoperoxidasa, la eosinófilo peroxidasa y en la mieloperoxidasa, pero sólo en la mieloperoxidasa existe un tercer enlace covalente vinil-sulfonio entre el azufre de un residuo de metionina y el carbono β del grupo vinilo en posición 2 del hemo.

Aunque la posibilidad de que en algunos casos la unión covalente del hemo sea accidental, la conservación de esta característica entre diferentes miembros de la misma familia disipa en gran medida la duda. Aunque en muchos casos las ventajas estructurales, mecánicas o fisiológicas de la unión covalente del hemo siguen siendo desconocidas, en otros casos sí que han sido descritas, como se comentará posteriormente, por lo que la hipótesis de que la unión covalente del hemo confiere alguna ventaja o especificidad funcional y/o estructural se ve reforzada.

3.3. Breve introducción al análisis espectrofotométrico de hemoproteínas.

Las porfirinas son compuestos aromáticos, por lo que el macrociclo de la porfina es un sistema altamente conjugado con 26 electrones π en total. Como consecuencia, presentan bandas de absorción en la región del visible muy intensas, así como una fuerte coloración. Las propiedades únicas del cromóforo de las hemoproteínas permiten emplear una enorme variedad de técnicas espectrofotométricas que proporcionan información detallada acerca de la naturaleza de los ligandos del hemo. La combinación de diversas técnicas, como la espectroscopía de absorción UV/visible, dicroísmo

circular (DC) magnético, resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia de Raman y resonancia magnética nuclear (RMN), proporciona una visión detallada de la naturaleza de la coordinación, unión y estado de oxidación del hemo (Wilks, 2002).

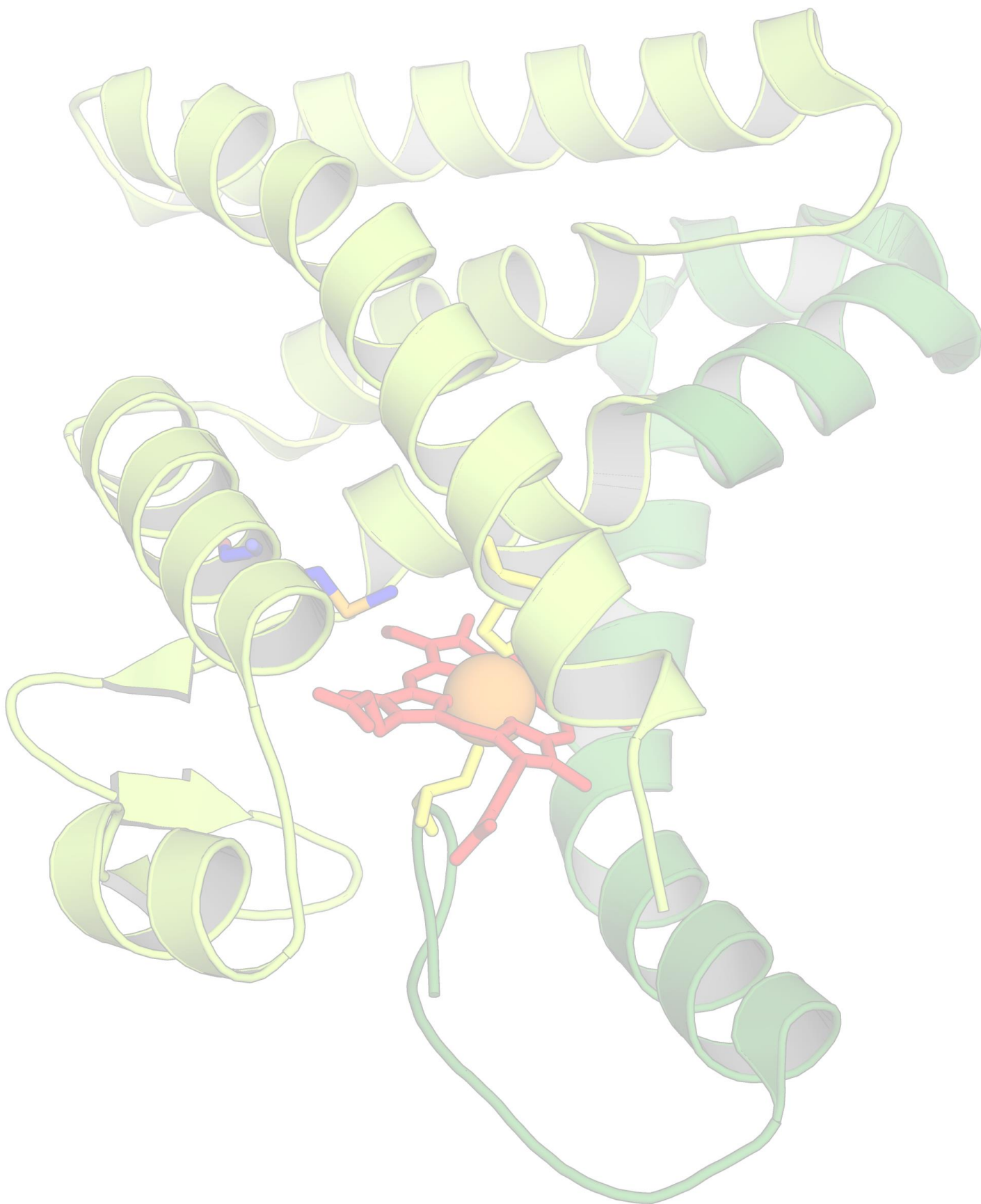
En cuanto a la espectroscopía de absorción UV/visible, aunque limitada, proporciona una información valiosa acerca del estado redox (del estado de oxidación), del estado de espín electrónico (es decir, de la configuración electrónica del hierro del hemo) y de la naturaleza del ligando proximal. Así, en un espectro de absorción en la región del visible de una hemoproteína, podemos encontrar varias bandas. La banda de absorción localizada en la región entre 390-430 nm, corresponde al Soret (o banda γ) y es la banda más intensa de estos sistemas. Se debe a una transición electrónica π - π^* , y su posición es sensible tanto el estado de espín del hierro como a la naturaleza de los ligandos axiales coordinados y al entorno del grupo hemo (Myer y Pande, 1978). En tabla 1 se recogen brevemente las características de absorción espectroscópicas que se pueden observar en un espectro de absorción en la región del visible de una hemoproteína (tabla adaptada de (Myer y Pande, 1978)):

Tabla 1. Características de absorción espectroscópicas de hemoproteínas.

Banda	Posición (nm)	Asignación	Propiedades
δ (N)	300-380	Porfirina π - π^*	$\epsilon \approx 10^3$ - 10^4 polarización x,y
Soret (B o γ)	390-430	Porfirina π - π^*	$\epsilon \approx 10^4$ - 10^5 polarización x,y
α y β	510-580	Transferencia de carga metal \rightarrow ligando	$\epsilon \approx 10^2$ - 10^3 Fe ²⁺ polarización x,y
CT1	600-655	Transferencia de carga ligando \rightarrow metal	$\epsilon \approx 10^2$ características del Fe ³⁺ en estado de alto espín

El dicroísmo circular magnético es una técnica de diferencia que dará lugar a componentes positivas y negativas de modo que la información obtenida de su espectro es más completa que la del espectro de absorción UV/visible. El espectro obtenido es una huella dactilar de la proteína útil para determinar los ligandos coordinados, el estado de oxidación y el estado de espín electrónico de la hemoproteína (Vickery, 1978).

La asignación del ligando proximal en una hemoproteína de estructura desconocida mediante dicroísmo circular, así como mediante espectroscopía UV/visible, EPR y resonancia de Raman, es dependiente de la comparación con otra hemoproteína cuyo ligando proximal se conozca como en el caso de la mioglobina (histidina), la catalasa (tirosina) y el citocromos P450 (cisteína).



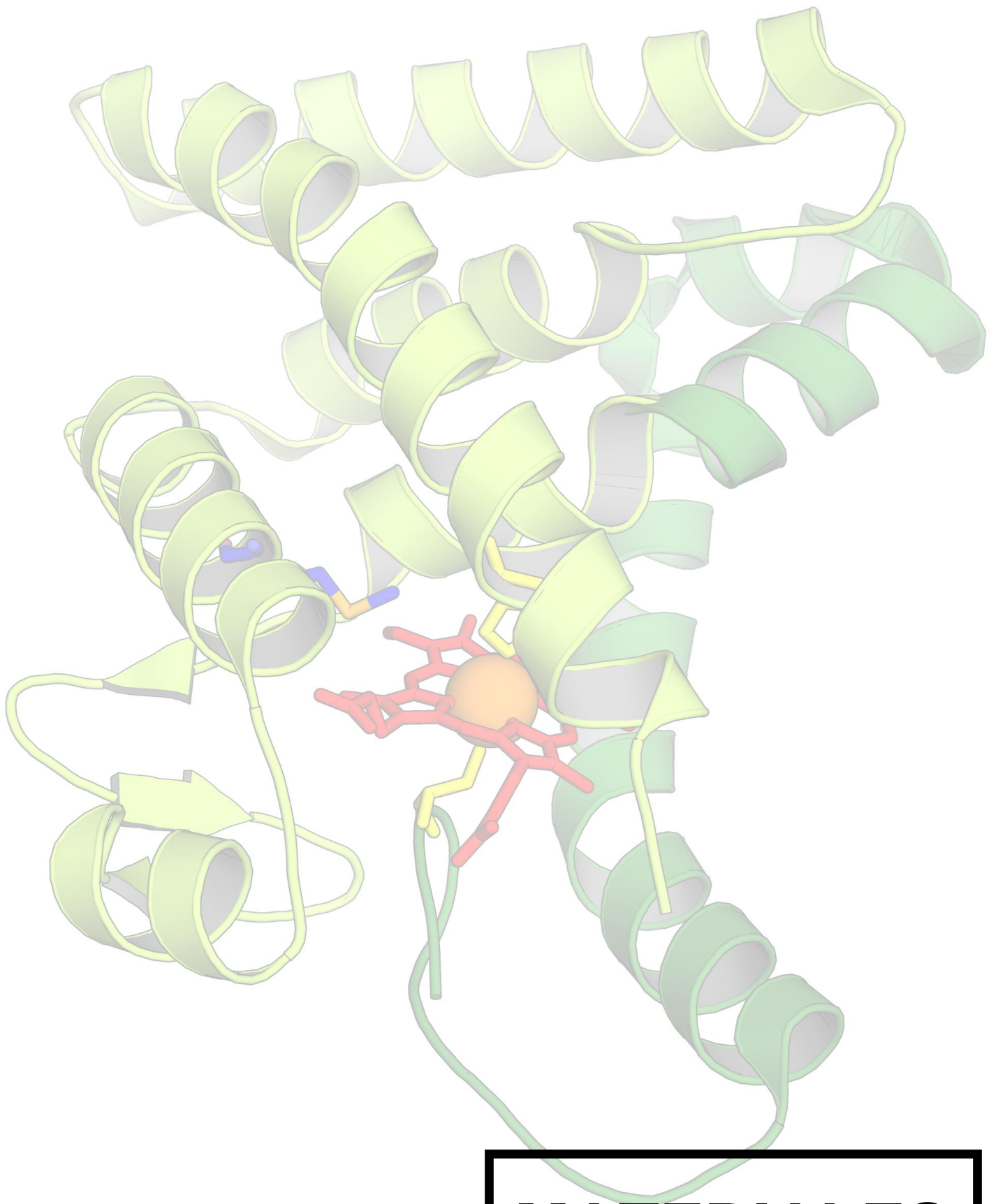
OBJETIVOS

El objetivo inicial que nos llevó a entrar a caracterizar el dominio de unión a ligando (LBD) de E75 de *Drosophila melanogaster* y *Oncopeltus fasciatus* fue llevar a cabo estudios de cristalografía de proteínas en el laboratorio del Dr. Ortiz de Montellano en la Universidad de California durante una estancia corta. Por ello, una vez obtenidos los cDNAs procedimos a clonar estas dos proteínas en el vector pCWori, expresarlas en bacterias y purificar las proteínas recombinantes. A pesar de que hasta la fecha no hemos sido capaces de obtener cristales de proteína que difracten, la caracterización espectroscópica inicial del LBD de E75 de *D.melanogaster* y *O. fasciatus* claramente nos llevó a pensar que había diferencias esenciales que merecían la pena ser exploradas. Por ello, pronto pasamos también a caracterizar sus ortólogos en otros dos insectos, *Bombyx mori* y *Blattella germanica*, con el fin de ver cómo se comportaban en cuanto a sus propiedades espectroscópicas y reactividad con gases se refiere.

En eucariotas, el único sensor de •NO caracterizado en profundidad hasta la fecha ha sido la guanilato ciclasa soluble, una hemoproteína que sintetiza cGMP. Lógicamente, el hecho de que se descubriera recientemente que en insectos E75 es una proteína que funciona como un receptor nuclear para el •NO nos llevó a mostrar interés por esta familia de proteínas. Además, el hecho de que experimentos recientes hayan demostrado que los ortólogos humanos de E75 denominados Rev-erba y Rev-erbβ funcionen como sensores de hemo y de gases diatómicos, demuestra la importancia funcional de esta familia de proteínas.

Los objetivos que nos planteamos en esta parte fueron:

- Intentar obtener cristales de proteína del dominio de unión a ligando de E75 de *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori* que difracten, con el fin de determinar su estructura tridimensional.
- Determinar las propiedades espectroscópicas y la reactividad frente a gases diatómicos del dominio de unión a ligando de E75 de cuatro proteínas de insecto.
- Caracterizar la unión covalente entre el grupo hemo y la cadena polipeptídica, encontrada en el LBD de *O. fasciatus* y *B. germanica* ausente en sus ortólogos de *D. melanogaster* y *B. mori*.



**MATERIALES
Y MÉTODOS**

MATERIALES.

1. Reactivos de uso general.

Los tampones, oligonucleótidos y reactivos comunes de laboratorio se obtuvieron de Sigma-Aldrich salvo excepciones señaladas. La polimerasa *Pfu*, la T4 DNA ligasa, las enzimas de restricción y los marcadores de masa molecular se obtuvieron de Fermentas. La resina Ni-NTA agarosa, de Qiagen y la columna PD-10 de Amersham Biosciences. Para concentrar las proteínas se emplearon los filtros para centrifuga Amicon® Ultra 15 de Millipore. Los gases CO y •NO, de Airgas. La porfirina no natural Fe(III) mesopofirina IX (mesohemo) se obtuvo de Livchem (Mannheim, Germany).

2. Líneas celulares: bacterias.

DH5αF': F⁻endA1 hsdR17 (r_k,m⁺_k) supE441 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR [Φ80 dlac Δ (lacZ) M15]. Cepa de *E. coli* utilizada para la clonación de los distintos cDNAs.

BL21(DE3): F⁻ompT[lon]hsdS_B(r_b,m_b)gal[dcmlacZ]con DE3, profago 1 que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7. Cepa de *E. coli* deficiente en las proteasas lon y ompT. Se empleó para la expresión de las proteínas recombinantes.

RP523: cepa de *E. coli* deficiente en la biosíntesis de hemo y permeable a porfirinas. Se obtuvo de la colección de cepas de *E. coli* de "The Coli Genetic Stock Center" de la Universidad de Yale (New Haven, USA). La adición de análogos de porfirina al medio permite generar hemoproteínas que contienen porfirinas no naturales para su comparación con la proteína silvestre, lo que supone un buen método para determinar qué grupos del hemo están implicados en la unión covalente con las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína.

3. Medios de cultivo para bacterias.

LB: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0 y agar 1.5% para medio sólido. Este medio se empleó para amplificar todos los plásmidos por miniprep, en células DH5α. Cuando se preparó LB-agar (medio sólido), se añadió el antibiótico ampicilina o kanamicina (concentración final 100 µg/ml).

2XYT: Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0. Este medio se empleó para la expresión de proteínas recombinantes en células BL21.

4. Plásmidos.

Plásmido pCWori (pTACTAC). Es un regalo de R. Fletterick (Universidad de California, San Francisco). Utilizado para la expresión de las proteínas recombinantes en bacterias *E. coli*. El promotor *tac* duplicado permite la expresión continua y sostenida de proteína tras la inducción con IPTG. El gen que codifica para la proteína de interés que se desea expresar de forma recombinante, se liga en el sitio de multiclonación en la orientación correcta y con el correcto marco de lectura de modo que se añade una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que permite la posterior purificación de la proteína recombinante mediante una columna de afinidad Ni-NTA agarosa. Este vector se replica de forma autónoma en *E. coli* y confiere resistencia a ampicilina.

MÉTODOS.

1. Clonación de las distintas construcciones de los LBDs de E75 de los diferentes insectos en el vector de expresión recombinante en bacterias pCWori.

Todas las construcciones fueron clonadas entre los sitios de restricción NdeI (en el extremo 5') y XbaI (en el extremo 3') del vector de expresión bacteriano pCWori, en el que se introdujo una secuencia de 6 histidinas en fase con el extremo N-terminal de la proteína recombinante tal y como se describió anteriormente (Rodríguez-Crespo et al., 1999; Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). Las construcciones se comprobaron mediante secuenciación automática.

1.1. Clonación de los LBDs de E75 de los diferentes insectos.

El dominio de unión a ligando (LBD) de E75 de *Drosophila melanogaster* se obtuvo mediante PCR a partir de una preparación de cDNA de embriones de mosca empleando dos oligonucleótidos que amplificaran la secuencia publicada correspondiente al LBD. Se realizaron dos reacciones de PCR consecutivas. En una primera PCR se amplificó el LBD (aa 341-604) sin introducir ningún sitio de restricción, empleando el oligonucleótido directo (5'-ACCCAGAATCGCGGCCAGCAGCGAGCC-3') y el reverso (5'-GGGCGACTTGTCTGCTGGCCATCGCTGTTG-3'). A continuación se realizó una segunda PCR empleando como molde la banda amplificada en la primera PCR y los oligonucleótidos (5'-ACCCAGCATATGGGCCAGCAGCGAGCC-3', diana NdeI subrayada) y (5'-GGGCGACTTTCTAGACTAGCC ATCGCTGTTG-3', diana XbaI subrayada).

Del mismo modo, el DNA codificante para el LBD de E75B de *O. fasciatus* se amplificó mediante PCR empleando el cDNA completo extraído de embriones de *Oncopeltus* de distintas horas (18, 22, 26, 30 y 34 h), regalo del Dr. Deniz F. Erezyilmaz (Princeton University, USA) (Erezyilmaz et al., 2009). Primero se amplificó el LBD (aa 88-348) sin introducir ningún sitio de restricción, con los oligonucleótidos directo (5'-GCAGAGCACCAACTCCAAGTGCCAGGAG-3') y reverso (5'-CATTGAACCCACATTTCTGTGTTGCTG-3'). Luego se llevó a cabo una segunda PCR empleando como molde la banda amplificada en la primera PCR y los oligonucleótidos (5'-GCAGAGCACCAACCATATGTGCCAGGAG-3', diana NdeI subrayada) y (5'-CATTGAACCTAGATTTCTGTGTTGCTG-3', diana XbaI subrayada).

El DNA codificante para el LBD de E75A de *Bombyx mori* (aa 142-397) se amplificó mediante PCR empleando como molde el cDNA completo de E75A de *Bombyx mori* cedido por el Dr. Kostas Iatrou (Atenas, Grecia) (Swevers et al., 2002b) y los oligonucleótidos directo (5'-TCTCGTGACATATGCAAGCAGCTGCCGC-3', diana NdeI subrayada) y reverso (5'-GGAATCTGTCTAGAAACTCCTTCTTCTTC-3', diana XbaI subrayada).

El DNA codificante para el LBD de E75A de *Blattella germanica* (aa 148-402) se amplificó mediante PCR empleando como molde el cDNA completo que nos proporcionó el Dr. David Martín Casacuberta (Barcelona, España) (Mane-Padros et al., 2008) y los oligonucleótidos directo (5'-CAGAGCTCGAACCATATGTCTCAGGAG-3', diana NdeI subrayada) y reverso (5'-GCTGTTCTAGAGTTATAACTGTTG-3', diana XbaI subrayada).

1.2. Clonación de los mutantes puntuales del LBD de E75B de *O. fasciatus*: mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida se realizó mediante el método "quick-change mutagenesis". El aminoácido Glu158 de *Oncopeltus* se substituyó por lisina: para ello se emplearon los oligonucleótidos directo (5'-ACAGGCCAACAAAGCTTCTTCAGGAC-3') y reverso (5'-GTCCTGAAGAAGCTTTTGTGGCCTGT-3'). Se introdujo una diana HindIII para el análisis de las colonias obtenidas.

El aminoácido Gln156 se reemplazó por arginina para lo que se diseñaron los oligonucleótidos directo (5'-CAACCACTGACCGGCCGACAAGAACTT-3') y reverso (5'-AAGTTCTTGTCGGCCGTCAGTGGTTG-3'). Se introdujo un sitio de restricción EagI para el análisis de las colonias obtenidas.

La Met245 se substituyó por treonina mediante los oligonucleótidos directo (5'-GATTTCTCATGGACAGTACTTTTGACTTTGCTGAG-3') y reverso (5'-CTCAGCAAAGTCAAAAGTACTGTCCATGAGAAATC-3'). Se introdujo la diana Scal para el posterior análisis de las colonias obtenidas.

1.3. Construcción de las proteínas quimera del LBD de E75 de *Drosophila melanogaster*-*Oncopeltus fasciatus* (*Dros-Onc* y *Onc-Dros*).

Tras realizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del LBD de *D. melanogaster* y *O. fasciatus* con el programa Clustal (Figura 6), seleccionamos una secuencia corta -TLLKAG- situada aproximadamente en medio de la hélice α 5 del LBD que era idéntica en ambas proteínas. Se introdujo un sitio de restricción silencioso AflII en esta posición mediante mutagénesis puntual dirigida tanto en el cDNA de *Drosophila* como en el de *Oncopeltus*. La Quimera *Dros-Onc* está constituida por la combinación del fragmento N-terminal del LBD de E75 de *Drosophila* (aa 341-446) y el fragmento C-terminal del LBD de E75 de *Oncopeltus* (aa 194-348). La Quimera

Onc-Dros está constituida por la fusión del fragmento N-terminal del LBD de E75 de *Oncopeltus* (aa 88-199) y el fragmento C-terminal del LBD de E75 *Drosophila* (aa 440-604).

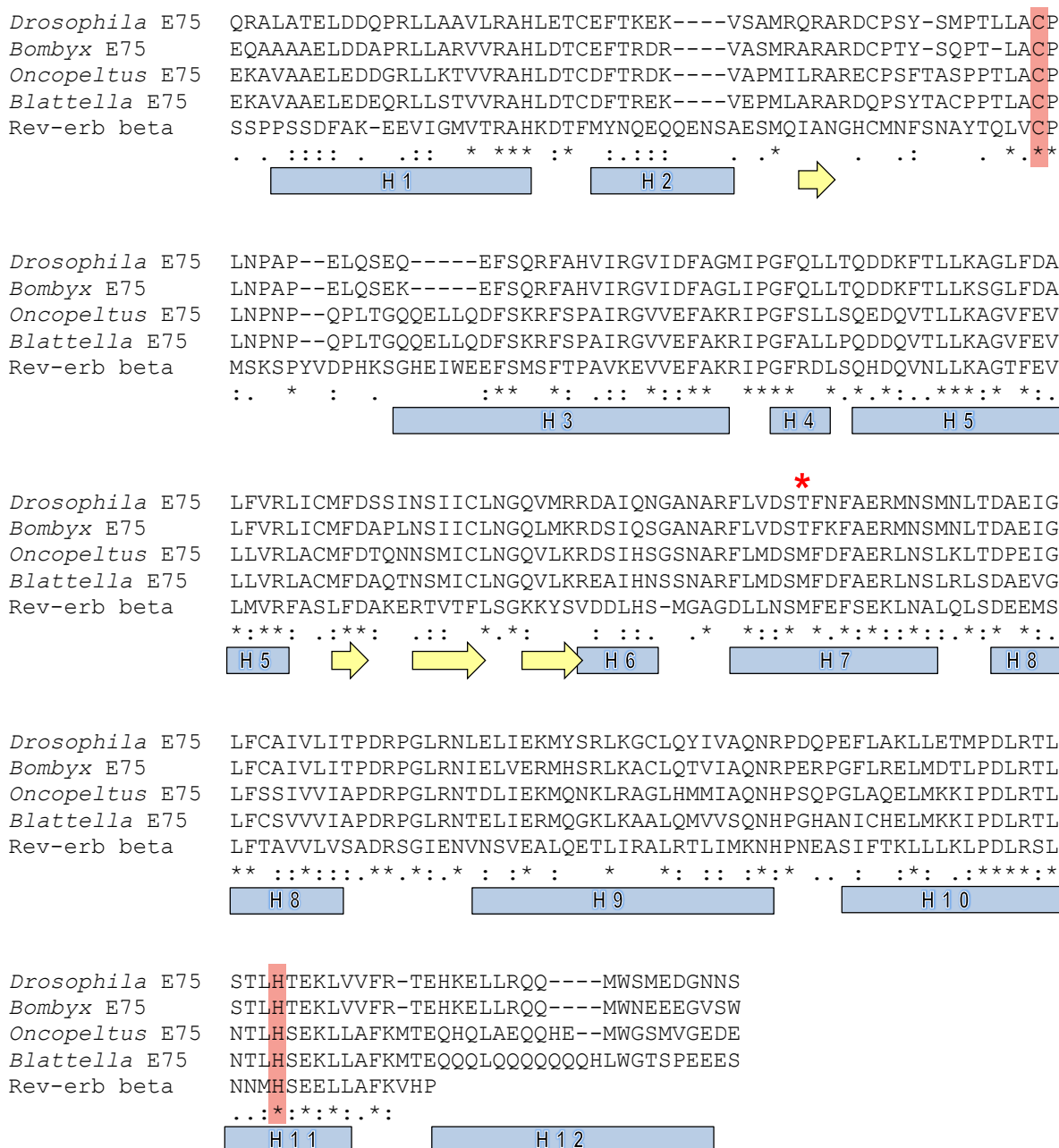


Figura 6: Alineamiento de las secuencias de los dominios de unión a ligando (LBDs) de E75 de *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Oncopeltus fasciatus* y *Blattella germanica* y del LBD de su ortólogo en humanos Rev-erbβ. Mediante rectángulos azules y flechas amarillas se muestran, respectivamente, la predicción de las hélices α y cadenas β. La posición de los residuos de Cys e His conservados que se coordinan con el grupo hemo se han marcado en rojo. Esta predicción se basa en la estructura cristalina obtenida para el fragmento tríptico del LBD Rev-erbβ humano con hemo unido, que comprende de las hélices α 3 a 11 (Pardee et al., 2009). La estructura cristalina de este mismo fragmento sin hemo unido adopta un plegamiento tridimensional similar (Woo et al., 2007). El LBD de Rev-erbβ (así como el de Rev-erba) carece de la hélice α C-terminal (hélice 12) que es necesaria para el reconocimiento del coactivador (Renaud et al., 2000), si bien esta hélice sí está presente en los LBDs de E75 de insectos. La predicción de la posición de las hélices 1, 2 y 12, se ha inferido tras la comparación con la estructura atómica del LBD de otros receptores nucleares cristalizados (Stehlin et al., 2001). El asterisco rojo (*) en la hélice α 7 señala la Met245 de *O. fasciatus*, implicada probablemente en la unión covalente del grupo hemo. Para la comparación de las secuencias se ha empleado el programa Clustal (Goujon et al., 2010).

2. Expresión en *E. coli* y purificación de los LBDs de E75 de los distintos insectos.

Para llevar a cabo la expresión recombinante de las proteínas, se transformaron las células competentes BL21(DE3) de *E. coli* con los distintos vectores. Las secuencias exactas de las proteínas recombinantes que se obtuvieron se muestran en la Figura 7. Las células se crecieron en medio 2XYT en ausencia de hemina, hasta una DO600 de ~1 antes de inducir mediante la adición de IPTG 1 mM durante 18 h a 25°C. Tras centrifugar, las bacterias se resuspendieron en Tris-HCl 100 mM (pH 7.0), en presencia de lisozima y de los inhibidores de proteasas leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml y PMSF 2 µM y se lisaron mediante sonicación. Las distintas proteínas se purificaron en dos etapas. Primero mediante una cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. La columna se lavó exhaustivamente con 200 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.0), NaCl 500 mM, seguido de un lavado con 100 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.0), NaCl 250 mM, imidazol 30 mM y por último un tercer lavado con 100 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.0), NaCl 250 mM, imidazol 45 mM. Para eluir se empleó un tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7.0) con imidazol 200 mM. Las fracciones con color recogidas se juntaron y dializaron en Tris-HCl 25 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM. A continuación, se llevó a cabo una segunda etapa de purificación con un sistema de FPLC (Pharmacia Biotech), mediante una cromatografía de exclusión molecular aplicando las distintas proteínas dializadas en una columna preparativa Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada previamente en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM. Las fracciones con color se aplicaron en un PAGE-SDS al 15% lo que permitió la selección de las fracciones que contenían E75 pura. Las fracciones más puras se juntaron, se concentraron empleando los filtros para centrifuga Amicon® Ultra 15 (Millipore) de tamaño de poro de 10 kDa. Las alícuotas obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -20°C.

3. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de *O. fasciatus* en la cepa RP523 deficiente en la síntesis de hemo.

La expresión recombinante en la cepa RP523 sólo puede realizarse con plásmidos que utilizan promotores endógenos de *E. coli*, porque esta cepa no tiene el lisógeno del fago λ DE3 que expresa el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, cuando se induce con IPTG. El plásmido pCWori es adecuado para una expresión robusta de proteína porque está bajo el control del promotor Taq. En primer lugar se generaron bacterias RP523 competentes siguiendo un protocolo estándar de preparación de células *E. coli* competentes mediante el método de cloruro de calcio, con la diferencia de que los cultivos se crecieron en presencia de hemina a 30 µg/ml (se preparó un stock 200X en DMSO) cubiertos con papel de aluminio ya que las porfirinas son fotodegradables. Las bacterias se transformaron con el plásmido de expresión del LBD de E75B de *Oncopeltus fasciatus* y se sembraron en placas de LB-ampicilina con hemina (30 µg/ml) y se incubaron cubiertas con papel de aluminio a 37°C toda la noche. La expresión se llevó a cabo en condiciones aeróbicas. Se picó una colonia individual de la placa de hemina en 20 ml de LB-ampicilina (sin añadir hemina) y se incubó a 37°C, 250 rpm durante toda la noche. El precultivo se diluyó en 250 ml medio de expresión 2XYT-ampicilina. En el momento de inducir la expresión con IPTG 1 mM, se adicionó la porfina de interés a concentración final de 30 µg/ml (a partir del stock 200X en DMSO) siguiendo así el protocolo descrito (Woodward et al., 2007) y la expresión se realizó durante 18 h a 25°C. Como control positivo, se llevó a cabo la sustitución con Fe(III) protoporfirina IX (hemina) para verificar que el sistema funcionaba bien y era posible reconstituir la hemoproteína y que conservara sus características. Asimismo, se llevó a cabo la sustitución con el análogo Fe(III) mesoporfirina IX (mesohemo). La expresión se llevó a cabo a 25°C durante toda la noche y la purificación se realizó siguiendo el protocolo descrito para las proteínas silvestres.

4. Reducción del hierro del grupo hemo y unión de los gases CO y •NO.

Para llevar a cabo la caracterización espectroscópica de cada una de los LBDs purificados en su estado oxidado Fe(III) y reducido Fe(II), así como los aductos de la proteína reducida en presencia de CO y •NO, las muestras (3-5 µM, V_{final} 700 µl) fueron preparadas en condiciones anaeróbicas en el interior de una cámara anaerobia, bajo una atmósfera de nitrógeno. Las muestras de proteína se prepararon en tampón de anaerobiosis Tris 25 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM. Este tampón se calentó a ebullición y se eliminó el oxígeno inyectando argón durante 30 minutos. El día previo a su uso se introdujo en la cámara anaerobia y se dejó destapado y agitando para conseguir su equilibrio con la atmósfera de la cámara. El volumen necesario de proteína se dispuso en un vial y antes de introducirlo en la cámara anaerobia se purgó el oxígeno de las muestras mediante la inyección de argón a través del septum durante ~5 min. La muestra correspondiente al estado oxidado Fe(III) se preparó añadiendo tampón de anaerobiosis hasta un volumen final de 700 µl. La reducción del Fe(III) de las muestras de proteína se llevó a cabo mediante la adición de una solución stock de ditionito sódico preparada anaeróticamente a concentración final 1 mM. Para quitar el exceso de ditionito de la muestra reducida ya que el ditionito sódico destruye el •NO, y siempre trabajando en el interior de la cámara, se hizo pasar la muestra por una columna PD-10 previamente tratada con 1 ml de ditionito sódico 1 mM seguido de 50 ml de tampón de anaerobiosis. Se midió el

volumen eluido y se ajustó para que la concentración final en 700 µl fuera la deseada (3-5 µM). Las muestras de proteína reducidas se dispusieron en una cubeta anaeróbica cerrada con un tapón de rosca con un septum de silicona y se sacaron de la cámara anaerobia. Los aductos con CO o •NO fueron preparados mediante la inyección de CO(g) o •NO(g) con una jeringa hermética para gases (jeringa Hamilton GASTIGHT®) a través del septum que sellaba la cubeta, seguido de una agitación suave de la muestra. En general, se inyectaron 100-200 µl de gas CO o •NO para obtener la completa conversión al aducto deseado. Los espectros de absorción fueron registrados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-visible (Varian) hasta que no se observaron más cambios.

5. Formación de un hemocromo con piridina.

Este método permite la medida de la concentración de hemo, pero también permite determinar si el grupo prostético de la proteína es hemo *a*, hemo *b* o hemo *c*. En medio básico, los aminoácidos de la proteína coordinados a través de un átomo de nitrógeno con el hemo son reemplazados por piridina. Se preparó una solución *stock* de piridina al 34% (v) en agua que contenía NaOH 400 mM. A continuación, de 10 a 50 µl de proteína concentrada se mezclaron con la solución de piridina hasta un volumen final de 500 µl, se depositaron en una cubeta de 0.5 ml y se registró el espectro en estado oxidado entre 500 y 600 nm (línea base). Se añadieron unos granitos de ditionito sódico sólido (2-5 mg) y la muestra se mezcló por inversión de la cubeta sellada con parafilm; así, se registraron sucesivos espectros de los piridina-hemocromos reducidos en un espectrofotómetro Beckman DU 640, a intervalos de 1 min hasta que no se observaron más cambios. El hemocromo resultante es cuantificado mediante el espectro de diferencia que se obtiene al restarle al espectro del compuesto reducido el del compuesto oxidado (línea base) (Berry y Trumpower, 1987).

6. Análisis mediante HPLC de la unión covalente del grupo hemo a los LBDs.

Para estudiar si el hemo estaba o no unido covalentemente en cada uno de los LBDs, se aplicó cada una de las proteínas purificadas en un sistema de HPLC bajo condiciones ácidas que favorecen la disociación del grupo hemo siempre y cuando no esté unido covalentemente (DePillis et al., 1997). Para el análisis de las distintas proteínas se inyectaron 100 µg de cada una en una columna de fase reversa Beckman Coulter Ultrasphere C18 de 250 x 4.6 mm empleando un aparato de HPLC Beckman Coulter. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (con ácido trifluoroacético al 0.1%) del 25-80% durante 60 min (flujo 1 ml/min) y se registró la absorbancia a 214 y 400 nm, longitudes de onda a la que absorben respectivamente el enlace peptídico y el grupo hemo. Como control del tiempo de elución del hemo libre, se preparó una solución *stock* de Fe(III) protoporfirina IX (hemina) para lo que se disolvieron 3 mg en 100 µl de NaOH 0.1 M, seguido de la adición de 900 µl de agua y posterior filtrado con un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro. 10 µl de esta solución de hemina se diluyeron en 140 µl de agua (con ácido trifluoroacético al 0.1%) para su aplicación en la columna de HPLC. Del mismo modo se preparó y aplicó una muestra de Fe(III) mesoporfirina IX.

7. Dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se registraron entre 250-700 nm a 25 °C en un dicrógrafo Jasco J-715 empleando una cubeta de paso óptico de 0.1 cm. El tampón empleado fue Tris 20 mM (pH 8.5). Se acumularon un mínimo de 5 espectros de cada muestra y en cada caso se restó la contribución del tampón. Antes de realizar la representación de los gráficos, los datos de elipticidad fueron convertidos a elipticidad molar por residuo. La concentración de proteína se determinó por análisis de aminoácidos.

8. Aislamiento y caracterización de hemopéptidos.

Para el análisis de los hemopéptidos, el LBD de E75B de *O. fasciatus* (30 µl de una disolución de proteína a 4.5 mg/ml en Tris 20 mM (pH 8.5)) se digirió con tripsina (20 µg) en 220 µl de Tris 0.09 mM (pH 7.0), durante 3 h a 37 °C. Tras esta digestión parcial, 50 µg de proteína digerida fueron centrifugados y posteriormente inyectados en una columna de fase reversa Beckman Coulter Ultrasphere C18 de 250 x 4.6 mm en un aparato de HPLC Beckman Coulter, empleando en este caso un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (con ácido trifluoroacético al 0.1%) del 30-60% durante 20 min (a 1 ml/min) midiendo la absorbancia a 214 y 400 nm. Se recogieron los hemopéptidos eluidos a diferentes tiempos (es decir, aquellos péptidos que absorbieran a 400 nm), se concentraron y analizaron mediante espectrometría de masas. El LBD de E75B de *O. fasciatus* (37.5 µl de una disolución de proteína a 4 mg/ml en Tris 50 mM (pH 7), NaCl 100 mM) fue digerido también con proteinasa K (18.75 µg) durante 20 min a 37 °C. Tras esta digestión parcial, se inyectaron 50 µg de proteína digerida y fueron cromatografiados y analizados como se ha descrito anteriormente.

Secuencia exacta del LBD del receptor nuclear E75 de *Drosophila melanogaster* recombinante:

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MHHHHHNNEN LYFQGHMGQ RALATELDDQ PRLAAVLRA HLETCEFTKE KVSAMRQRR DCPSYSMP TL LACPLNPAP LQSEQEFSSR FAHVIRGVID

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
FAGMIPGFQL LTQDDKFTLL KAGLFDALFV RLICMFDSSI NSIICLNGQV MRRDAIQNGA NARFLVDSTF NFAERMNSMN LTDAEIGLFC AIVLITPDRP

210     220     230     240     250     260     270     280
GLRNLELIEK MYSRLKGCLQ YIVAQNRPDQ PEFLAKLLET MPDLRTLSTL HTEKLVVFRT EHKELLRQQM WSMEDGNNSD G
```

Secuencia exacta del LBD del receptor nuclear E75 de *Oncopeltus fasciatus* recombinante:

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MHHHHHMMQ EKAVAAELED DGRLLKT VVR AHLDTCDFT DKVAPMILRA RECPSFTASP PTLACPLNP PQLTGGQEL LQDFSKRFSP AIRGVVEFAK

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
RIPGFSLLSQ EDQVTLLKAG VFEVLLVRLA CMFDTQNSM ICLNGQVLKR DSIHSGSNAR FLMDSMFDEA ERLNSLKLTD PEIGLFSIV VIAPDRPGLR

210     220     230     240     250     260     270
NTDLIEKMQN KLRAGLHMMI AQNHPSQPL AQELMKKIPD LRTLNTLHSE KLLAFKMT EQ HQLAEQQHEI
```

Secuencia exacta del LBD del receptor nuclear E75 de *Bombyx mori* recombinante:

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MHHHHHMMQ AAAELDDAP LLARVVRHL DTCEFTDRV ASMRARARDC PTYSQPTLAC PLNPAPQLS EKEFSQRF AH VIRGVDFAG LIPGFQLLTQ

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
DDKFTLLKSG LFDALFVRLI CMFDAPLNSI ICLNGQLMKR DSIQSGANAR FLVDSTFKFA ERMNSMNLTD AEIGLFC AIV LITPDRPGLR NIELVERMHS

210     220     230     240     250     260
RLKACLQTVI AQNRPERPGF LRELMDTLPD LRTLSTLHTE KLVVFRT EHK ELLRQQMWNE EEGVF
```

Secuencia exacta del LBD del receptor nuclear E75 de la quimera *Dros-Onc* recombinante:

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MHHHHHMMQ QRALATELDD QPRLAAVLRA AHLETCEFTK EKVSAMRQRA RDCPSYSMP TL LACPLNPAP ELQSEQEFSSR RFAHVIRGVI DFAGMIPGFQ

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LLTQDDKFTL LKAGVFEVLL VRLACMFDQ NNSMICLNGQ VLKRSIHSG SNARFLMDSM FDEAERLNSL KLTDPEIGLF SSIVVIAPDR PGLRNTDLIE

210     220     230     240     250     260
KMQNKLRAGL HMMIAQNHP S QPGLAQELMK KIPDLRTLNT LHSEKLLAFK MTEQHQLAEQ QHEI
```

Secuencia exacta del LBD del receptor nuclear E75 de la quimera *Onc-Dros* E75 recombinante:

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MHHHHHMMQ EKAVAAELED DGRLLKT VVR AHLDTCDFT DKVAPMILRA RECPSFTASP PTLACPLNP PQLTGGQEL LQDFSKRFSP AIRGVVEFAK

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
RIPGFSLLSQ EDQVTLLKAG LFDALFVRLI CMFDSSINSI ICLNGQVMRR DAIQNGANAR FLVDSTFNFA ERMNSMNLTD AEIGLFC AIV LITPDRPGLR

210     220     230     240     250     260     270
NLELIEKMS RLKGCQYIV AQNRPDQPEF LAKLLETMPD LRTLSTLHTE KLVVFRT EHK ELLRQQMWSM EDGNNSDG
```

Figura 7: Secuencia de aminoácidos de los LBDs de E75 silvestres de *Drosophila melanogaster*, *Oncopeltus fasciatus* y *Bombyx mori* y de las proteínas quiméricas (*Dros-Onc* y *Onc-Dros*). Las proteínas expresadas tienen una extensión de 6 histidinas en su extremo N-terminal. El LBD de E75 de *D. melanogaster* tiene una secuencia de corte de la proteasa TEV (ENLYFQG) inmediatamente después de las 6 histidinas, que se introdujo con vistas a los intentos de cristalización. El aminoácido Glu158 dentro del bucle QELL que fue mutado en la proteína de *O. fasciatus*, aparece subrayado. También se muestran las secuencias de las quimeras *Dros-Onc* y *Onc-Dros*. Se ha subrayado la secuencia TLLKAG, compartida entre *Drosophila* y *Oncopeltus*, en la que se introdujo un sitio de restricción AflIII (mutación silenciosa) para crear las quimeras.

9. Análisis por espectrometría de masas.

Se depositó 1 µl de muestra sobre la placa MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la gota, se añadieron 0.5 µl de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) preparada a 3 mg/ml en acetonitrilo al 50% y de nuevo se dejó secar a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un análisis de los péptidos obtenidos tras la digestión con la proteasa correspondiente mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (espectros MS) en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en el centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Los péptidos seleccionados se sometieron a fragmentación automática (espectros MS/MS) para obtener la secuencia de aminoácidos empleando el 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). La secuenciación *de novo* a partir de los espectros obtenidos de la fragmentación de los péptidos se realizó con DeNovo tool software (Applied Biosystems) y las posibles secuencias fueron comprobadas y validadas manualmente.

10. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Esta es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados. Los espectros de EPR en onda continua (CW, o en modo estacionario) se registraron a baja temperatura (10°K) en un espectrómetro EMX Bruker que permite llevar a cabo experimentos en banda X (frecuencia de microondas en torno a 9.80 GHz) equipado con un criostato Oxford Instruments ESR 900 que utiliza un flujo continuo de helio líquido como refrigerante. Las muestras, a las que se añadió glicerol al 20% (v/v) como crioprotector, se introdujeron en un tubo de cuarzo sintético Suprasil para EPR. Los tubos se sellaron a vacío y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su análisis. Las señales registradas se analizaron con el programa WINEPR 2.11b de Bruker.

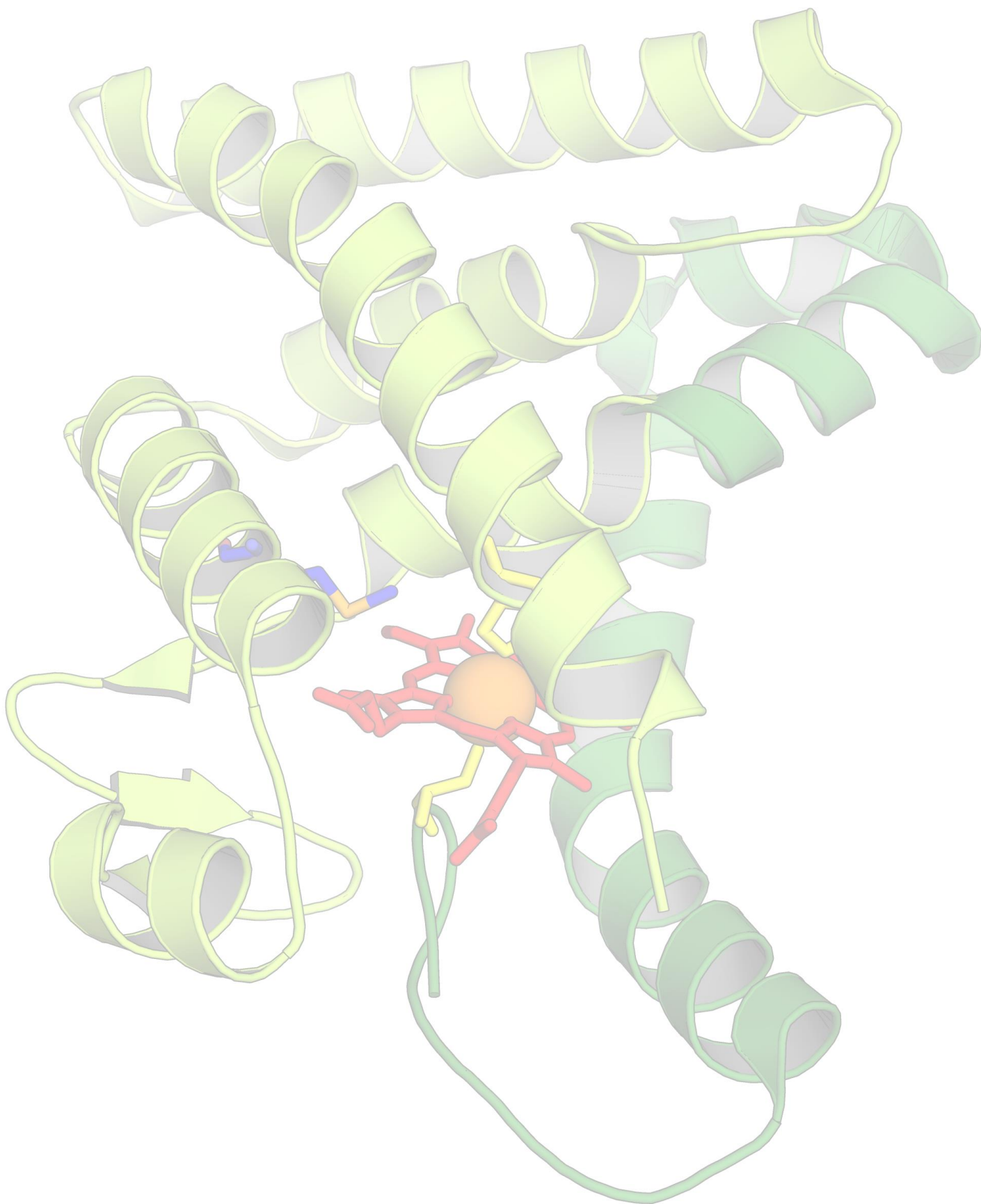
11. Intentos de cristalización de las hemoproteínas recombinantes.

Se trató de obtener cristales de los LBDs recombinantes de E75 de *Drosophila melanogaster* (aa 341-604), *Oncopeltus fasciatus* (aa 88-348) y *Bombyx mori* (aa 142-397) purificados, para resolver la estructura tridimensional mediante difracción de Rayos X. Los LBDs de E75 de los tres insectos, que contaban con una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal, se expresaron y purificaron tal y como se ha descrito anteriormente mediante cromatografía de afinidad en una resina de Ni-NTA seguido de una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 equilibrada en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM. Las fracciones con color se aplicaron en un PAGE-SDS al 15% para seleccionar aquellas fracciones más puras y centrales del pico de elución, las cuales se juntaron y concentraron empleando los filtros para centrifuga Amicon® Ultra 15 (Millipore) de tamaño de poro de 10 kDa, quedando a las siguiente concentración final: *D. melanogaster* 6.6 µg/µl y *Bombyx mori* 4.4 µg/µl y *Oncopeltus fasciatus* 8.8 µg/µl.

Para la obtención de cristales se empleó el método de la gota colgante (*hanging drop*). En una primera tentativa, se sembraron gotas de forma manual en placas de 24 pocillos, empleando los kits comerciales JBScreen Basic 1 (Cat.No. CS-121) basado en distintos tipos y porcentajes de diol y PEG, JBScreen Basic 2 (Cat.No. CS-122) basado en distintos tipos y porcentajes de PEG y JBScreen Basic 3 (Cat.No. CS-123) basado en distintos tipos y porcentajes de polímeros, alcoholes y sales) de JENA BIOSCIENCE. Para ello, se dispusieron 0.5 ml de cada una de las soluciones precipitantes en el pocillo y se colocaron 2 µl de la solución de proteína en el centro de un cubre-objetos de vidrio sobre los que se añadieron otros 2 µl de la solución del precipitante contenido en su respectivo pocillo. El cubre-objetos que contenía la gota de mezcla se dio la vuelta y con él se tapó el pocillo correspondiente, empleando grasa de vacío para el sellado. Este sistema cerrado evoluciona por equilibrio de vapor, y como la mezcla de proteína y precipitante en la gota está menos concentrada que la solución de precipitante en el pocillo, el agua de ésta se evapora, uniéndose a la solución del pocillo. Como resultado de este proceso, la concentración de la proteína y del precipitante aumenta lentamente en la gota y si las condiciones son las adecuadas, se formarán cristales. Las placas se sembraron por duplicado para llevar a cabo los experimentos de cristalización a RT y a 4°C. Mediante una lupa-microscopio, las gotas se fueron revisando periódicamente. En aquellas condiciones en las que se observó la formación de microcristales, se llevó a cabo un barrido en torno a la solución precipitante original. Para ello y en función de la composición de la solución comercial determinada, se preparó una batería de soluciones caseras que permitieran un barrido a diferentes pH o concentraciones de los componentes que resultaran más interesantes y determinantes para la formación de cristales, de modo que se obtuvieron 24 nuevas condiciones próximas a la original. Además, también se jugó con la relación Volumen de proteína: Volumen de precipitante, de modo que en todos los casos se dispusieron 2 gotas por pocillo a una relación 2 µl:2 µl, o bien 2 µl:1 µl ó 1 µl:2 µl, en función de que se considerara conveniente aumentar o disminuir la concentración de proteína.

En aquellas condiciones en las que se observó la formación de pequeños cristales que pudieran ser de naturaleza proteica y no salina, se procedió a su “pesca” y congelación en N₂ líquido, comprobando previamente que la solución en la que habían aparecido era crioprotectora. En los casos particulares en que la solución resultó no ser crioprotectora, se preparó la misma con porcentajes crecientes de glicerol, hasta dar con el menor porcentaje que hiciera que la solución sí fuera crioprotectora y se embebió el cristal en la misma antes de su congelación. Los posibles cristales de proteína se analizaron en el difractómetro.

En una segunda tentativa, se llevó a cabo la siembra de gotas mediante un robot de cristalización en placas de 96 pocillos empleando en este caso el método de gota posada (*sitting drop*) y trabajando sólo con los LBDs de E75 de *B. mori* y de *O. fasciatus*. En este caso se dispusieron gotas y se emplearon los kit comerciales: JBScreen Classic 1 a 10 y Wizard I a III. De nuevo se intentó la cristalización tanto a temperatura ambiente como a 4°C.

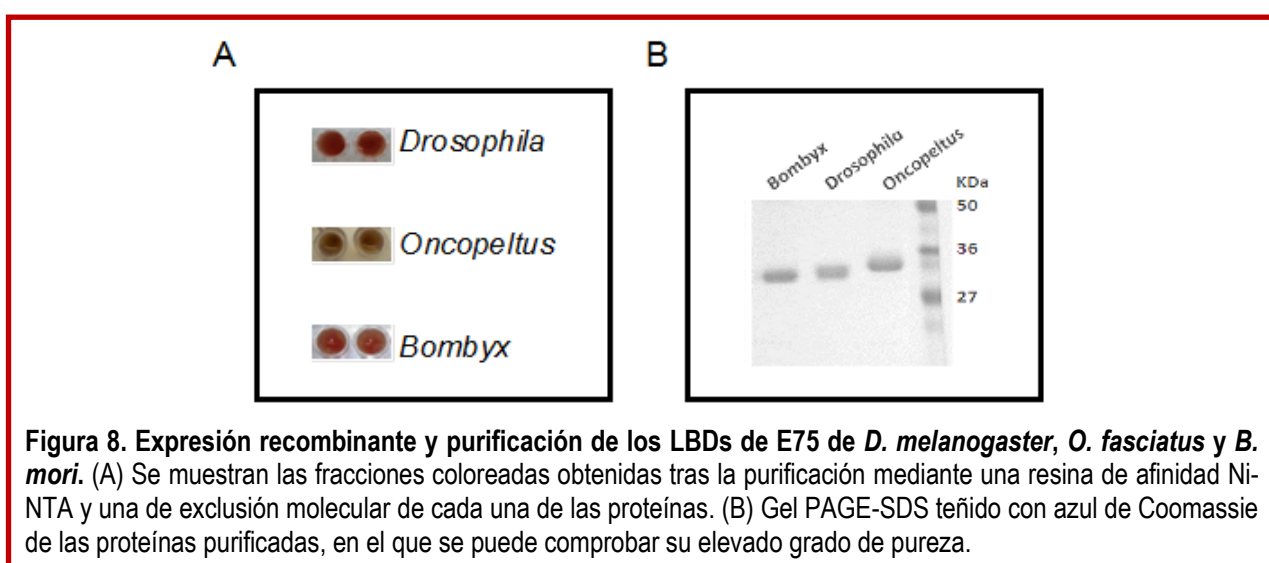


RESULTADOS

BLOQUE 1: Caracterización de los LBDs de E75 de diferentes insectos y descripción de la unión covalente del hemo en algunos de ellos.

1. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV/visible de los LBDs de E75 de *Drosophila melanogaster*, *Oncopeltus fasciatus* y *Bombyx mori* purificados.

Los LBDs de E75 de los tres insectos se clonaron en el sistema de expresión bacteriano pCWori, que introduce una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Este plásmido es muy adecuado para la expresión recombinante de hemoproteínas ya que al estar bajo el control del promotor Taq, no se paraliza el metabolismo bacteriano, el cual es necesario para que se sintetice el hemo que requiere la proteína (Rodríguez-Crespo y Ortiz de Montellano, 1996). La purificación de los LBDs, se llevó a cabo en dos etapas: primero mediante cromatografía de afinidad en una resina de Ni-NTA seguido de una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75. Los LBDs de E75 de los tres insectos fueron solubles y se purificaron a homogeneidad como hemoproteínas sin necesidad de suplementar hemina a los cultivos (Figura 8).



Se procedió a su caracterización mediante un espectro de absorción en la región del visible ya que los barridos espectrales en esta región proporcionan una información muy valiosa acerca del estado redox (del estado de oxidación) y del estado de espín electrónico (es decir, de la configuración electrónica del hemo). La banda correspondiente al Soret se debe a una transición electrónica que es sensible tanto el estado de espín del metal como de la naturaleza de los ligandos axiales coordinados y el entorno del grupo hemo. Los LBDs purificados de *D. melanogaster* y *B. mori* presentan un color rojo intenso y un Soret cuyo máximo está centrado a 424 nm y bandas α/β a 574/543 nm; sin embargo, el LBD de *O. fasciatus* es de color marrón y su espectro muestra el Soret desplazado a 415 nm, una banda α casi inexistente y una banda β centrada a 532 nm (Figura 9A). Los espectros de absorción de los LBDs

de los receptores nucleares de *D. melanogaster* y *B. mori* indican que su hemo está en estado oxidado y que su Fe(III) está en configuración de bajo espín hexacoordinado siendo los ligandos axiales una histidina y una cisteína (tiolato), en concordancia con estudios previos realizados con la isoforma de *D. melanogaster* (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). Sin embargo, el espectro de absorción correspondiente al LBD de *O. fasciatus* es similar al de la mioglobina, cuyo hemo contiene el Fe(III) en configuración de alto espín hexacoordinado (Gonzalez et al., 2002), siendo los ligandos axiales una histidina y probablemente una molécula de agua (Figura 9A). Además, el espectro de la proteína de *O. fasciatus* presenta una clara banda CT1 a 655 nm que indica que el Fe(III) está en configuración de alto espín (de Rosny et al., 2006; Neri et al., 1999).

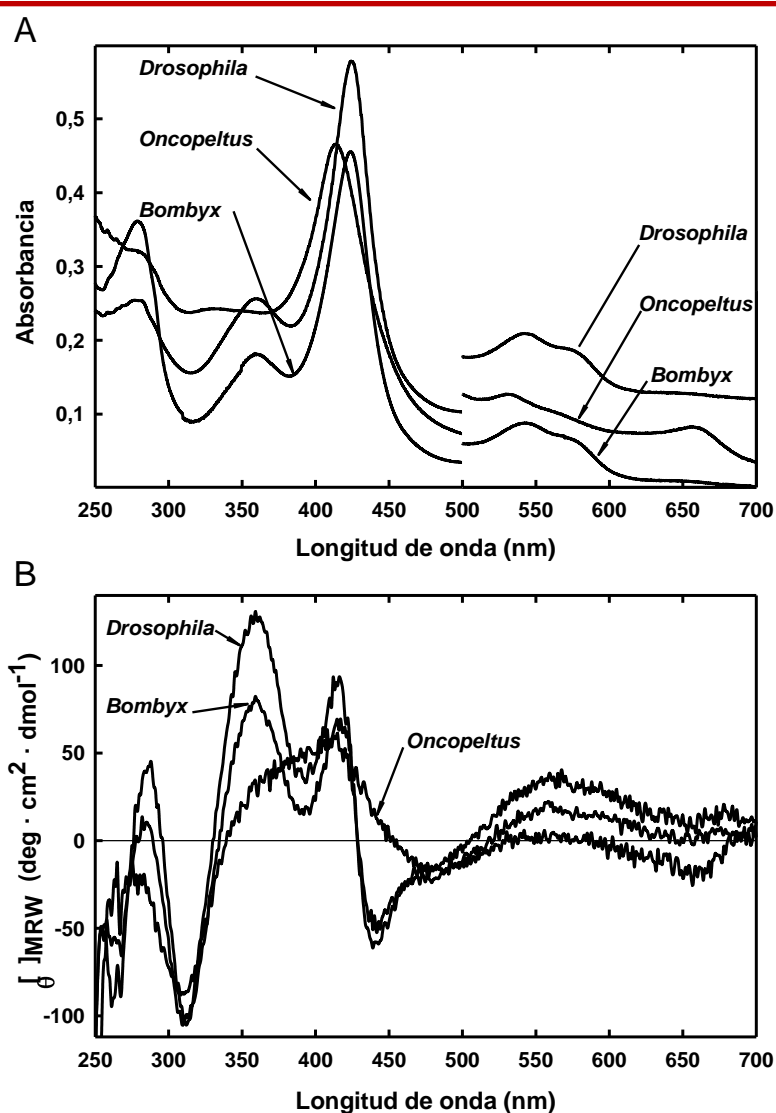


Figura 9. Caracterización espectroscópica de los LBDs de E75 en estado férrico *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori*. (A) Espectros de absorción UV/visible de los LBDs de E75 de *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori* en estado férrico entre 250-700 nm. Los espectros han sido desplazados verticalmente y las bandas α/β (500-700 nm) magnificadas. (B) Dicroísmo circular en las regiones del UV cercano y del visible de los LBDs de E75 de los tres insectos.

A continuación se compararon los espectros de absorción de las tres hemoproteínas con sus espectros de dicroísmo circular a idénticas longitudes de onda (Figura 9B). Los espectros de dicroísmo circular en la región en que absorbe el hemo son tan variados como los sistemas en sí mismos, siendo este espectro una huella dactilar de la proteína. El espectro de dicroísmo circular de hemoproteínas por encima de 300 nm es producto del grupo hemo, pese a que el grupo en sí mismo es ópticamente inactivo. Sin embargo cuando el hemo se encuentra en el entorno de la proteína, es un cromóforo ópticamente activo. La banda δ (transiciones porfirina $\pi-\pi^*$) que se observa a 360 nm en los espectros de absorción de los LBDs de *D. melanogaster* y *B. mori*, resulta también en una banda positiva en el espectro de dicroísmo circular, mientras que esta banda es casi inapreciable en los espectros de *O. fasciatus*. La banda γ (Soret) que se observa a 424 nm en los espectros de absorción de los LBDs de *D. melanogaster* y *B. mori* y a 415 nm en el espectro *O. fasciatus*, da lugar en todas ellas a una banda positiva en el espectro de dicroísmo circular, aunque las dos primeras proteínas también muestran una clara banda negativa a 440 nm en el espectro de dicroísmo ausente en el espectro de *O. fasciatus*. Las bandas α/β de los LBDs de *D. melanogaster* y *B. mori* también dan lugar a una señal positiva en sus respectivos espectros de dicroísmo circular si bien el espectro de DC de *O. fasciatus* no presenta una señal clara proveniente de su banda β . Es interesante resaltar que la banda CT1 a 655 nm del espectro de absorción de *O. fasciatus* mencionada anteriormente se refleja también como una banda negativa en su espectro de dicroísmo circular.

2. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV/visible de los complejos Fe(II)CO y Fe(II)NO de los LBDs de E75 de los tres insectos.

Los espectros de absorción registrados tras la reducción del hierro del hemo del LBD de E75 de *D. melanogaster* con ditionito sódico (forma reducida de la hemoproteína) en condiciones anaeróbicas, muestran un desplazamiento del pico de Soret a 425 nm y de las bandas α/β a 559 y 530 nm (Figura 10A, línea continua). Este sutil desplazamiento hacia el rojo del pico correspondiente al Soret tras la reducción del hierro se acompaña de un afilamiento de las bandas α/β .

El monóxido de carbono puede unirse al hierro ferroso del hemo del LBD, formándose un complejo Fe(II)CO que en el caso de *D. melanogaster* da lugar a un espectro que presenta el Soret con un máximo centrado a 420 nm y bandas α/β a 569 y 539 nm (Figura 10A, línea punteada), consistente con el que presentan hemoproteínas cuyo grupo hemo está hexacoordinado siendo el ligando axial la cadena lateral de una histidina (o bien otro donador neutro). La formación del complejo con $\bullet\text{NO}$ (Figura 10A, trazo discontinuo) en el LBD de E75 de *D. melanogaster* da lugar a la aparición de un pico ancho a 385 nm, similar al que presentan proteínas con el grupo hemo pentacoordinado (NO-hemo). Este desplazamiento hacia el azul del Soret junto con el ensanchamiento de las bandas α/β , es similar al de los complejos

pentacoordinados Fe(II)NO observados en *RrCooA* o en la guanilato ciclasa soluble (Reynolds et al., 2000; Stone et al., 1995).

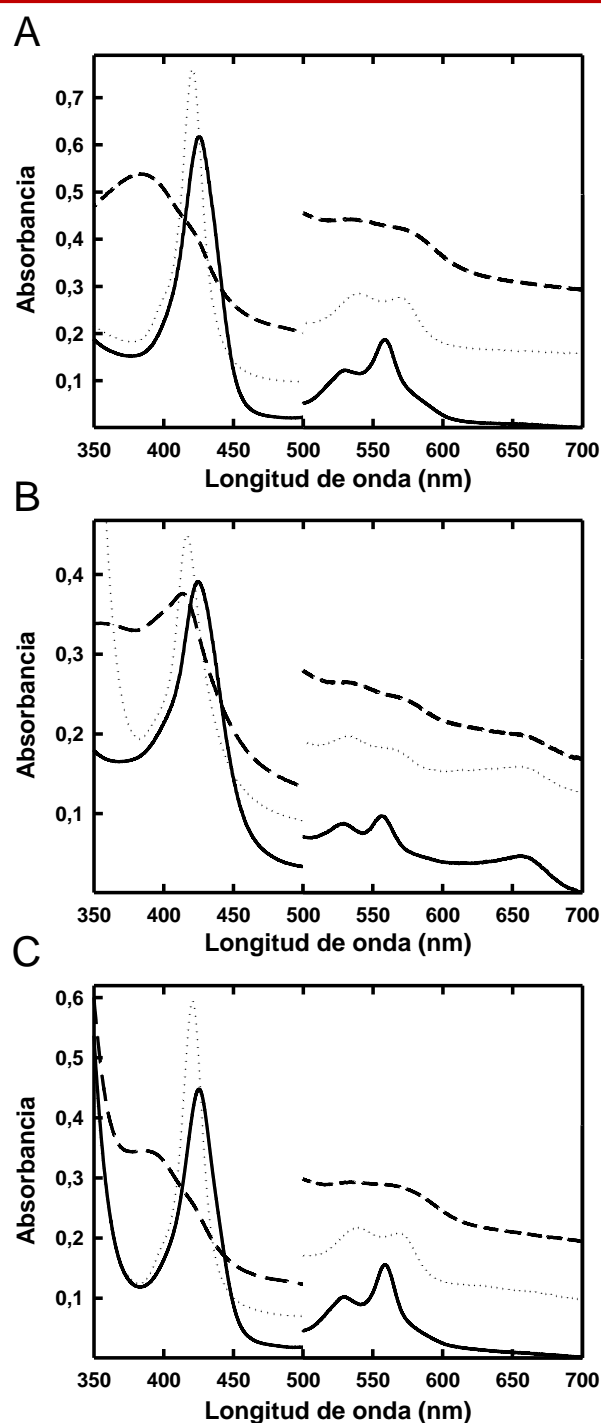


Figura 10. Caracterización espectroscópica anaeróbica de los LBDs de E75 de los tres insectos en estado ferroso en presencia de •NO y CO. Los LBDs de E75 de *D. melanogaster* (A), *O. fasciatus* (B) y *B. mori* (C) purificados en estado férrico fueron reducidos con ditionito sódico y se formaron los complejos con •NO y CO en condiciones anaeróbicas. El espectro correspondiente al estado ferroso está dibujado con línea continua, el complejo Fe(II)CO con línea punteada y el complejo Fe(II)NO con trazo discontinuo. Los espectros han sido desplazados verticalmente y las bandas α/β (500-700) nm.

En cambio, la reducción del hierro del hemo del LBD de E75 de *O. fasciatus* con ditionito sódico, da lugar a un desplazamiento hacia el rojo del Soret a 425 nm acompañado de un marcado afilamiento del pico así como de unas bandas α/β a 557 y 530 nm mucho mejor definidas (Figura 10B, línea continua).

De forma análoga a la que presenta su ortólogo de *D. melanogaster*, el complejo con CO del LBD de *O. fasciatus* (Figura 10B, línea punteada) muestra un afilado Soret a 420 nm, aunque las bandas α/β tienen una intensidad similar y están ligeramente desplazadas hacia el rojo a 566 y 533 nm. Por el contrario, el pico que se ve en el espectro correspondiente al complejo Fe(II)NO del LBD de E75 de *O. fasciatus* (Figura 10B, trazo discontinuo) está significativamente desplazado hacia el rojo comparado con el que se observa en el espectro de *D. melanogaster*, presentando el Soret a 416 nm y unas bandas α/β casi inexistentes. Este espectro recuerda a los de los complejos con •NO observados en hemoproteínas como la mioglobina (Decatur et al., 1996), neuroglobina (Herold et al., 2004) o ChCooA (Reynolds et al., 2000), en las que el hemo está hexacoordinado, siendo los ligandos del hierro el •NO y la cadena lateral de una histidina. Es interesante resaltar el hecho de que, si bien el espectro del complejo Fe(II)NO del LBD de E75 de *O. fasciatus* es claramente diferente del observado para la isoforma de *D. melanogaster*, es análogo al de su ortólogo en mamíferos Rev-erbb (Marvin et al., 2009; Pardee et al., 2009).

Finalmente, el espectro de absorción del LBD de E75 de *B. mori* en el estado ferroso muestra el Soret a 425 nm y bandas α/β muy bien definidas a 559 y 530 nm (Figura 10C, línea continua). Los espectros de los complejos Fe(II)CO (Figura 10C, línea punteada) y Fe(II)NO (Figura 10C, trazo discontinuo) del LBD de E75 de *B. mori* son muy similares a los de *D. melanogaster*, presentando el Soret el máximo a 421 y a 385 nm respectivamente, aunque de nuevo claramente distintos a los del LBD de E75 de *O. fasciatus*.

3. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica de los LBDs.

Los LBDs de E75 de los tres insectos en su estado férrico fueron analizados mediante EPR con el objetivo de caracterizar y asignar los ligandos axiales del hierro del hemo (Figura 11). Esta técnica permite estudiar especies químicas que tengan uno o más electrones desapareados (muestras paramagnéticas) y proporciona más información que la espectroscopía de absorción UV/visible acerca de la simetría del hemo, la identificación de los ligandos axiales y la comprensión de la estructura electrónica del hierro del hemo. La mayor sensibilidad del EPR a cambios en la simetría del hemo comparada con otros métodos espectroscópicos demuestra que es una herramienta útil para precisar la perturbación estructural provocada por diferentes ligandos axiales (Palmer, 1979).

El espectro de EPR correspondiente al LBD de E75 de *D. melanogaster* refleja heterogeneidad en la coordinación del hierro, en concordancia con datos obtenidos previamente (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009) y contiene al menos dos conjuntos de señales rómbicas bien resueltas dentro de un estrecho intervalo de valores g, asociadas con valores g correspondientes al hierro férrico en configuración de bajo espín. No se detectan señales de EPR correspondientes a configuración de alto espín. Los valores g obtenidos están dentro del intervalo encontrado para hemoproteínas que tienen que tienen por ligando axial una cisteína (tiolato-hemoproteínas), en las que el ligando cisteína determina las propiedades de

EPR del hierro del hemo. Si comparamos los valores g obtenidos con datos publicados anteriormente podemos concluir que una componente (valores g_z , g_y y g_x de 2.54, 2.26, 1.87) corresponde a un ligando del hierro donador de N- como histidina y la otra componente (2.33, 2.26, 2.04), es compatible con donadores de O- o S-. Los espectros de EPR de los LBDs de E75 de *B. mori* y *D. melanogaster* son muy similares, si bien el primero contiene una tercera componente con los siguientes valores g : E1 (2.54, 2.26, 1.87) y E2 (2.44, 2.26, 1.91), compatible con donadores de N- u O-, junto con la componente E3 (2.33, 2.26, 2.04). Por el contrario, el espectro de EPR correspondiente al LBD de E75 de *O. fasciatus* muestra una fuerte señal de EPR correspondiente a hierro férrico en configuración de alto espín con un valor g de 4.32 y una señal de menor intensidad pero también de alto espín con un valor g de 6.02. Aunque las distintas señales rómbicas no están lo suficientemente definidas, se puede inferir que los valores g son similares a los registrados en el espectro de EPR del LBD férrico de Rev-erb β (Marvin et al., 2009), el ortólogo en mamíferos de E75 de insectos. La contribución de cada componente a su espectro ha sido calculada y se muestra en la tabla 2; del mismo modo quedan recogidos valores de los parámetros de campo tetragonal (Δ/λ) y rombicidad (V/Δ) asociados con E1-E3.

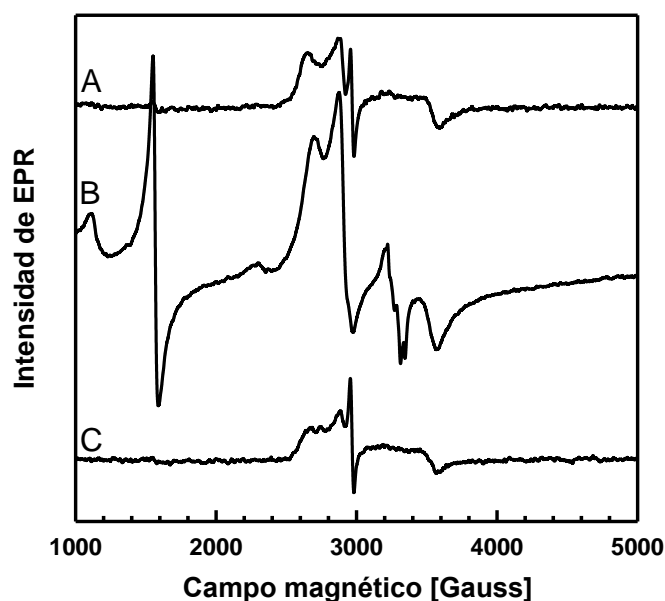


Figura 11. Espectros de EPR de los LBDs de E75 purificados. Los espectros fueron registrados bajo las siguientes condiciones experimentales: Tris-HCl 20 mM (pH 8.5), con glicerol al 20% (v/v); modulación de la frecuencia, 100 kHz; amplitud del campo magnético de modulación, 1 mT; potencia de microondas, 0.1 mW. (A) *Drosophila melanogaster* (324 μ M) en la región $g \sim 2$ a 10.6 °K. (B) *Oncopeltus fasciatus* (155 μ M) en la región $g \sim 2$ a 14 °K. (C) *Bombyx mori* (154 μ M) en la región $g \sim 2$ a 10.6 °K.

Tabla 2. Parámetros de EPR de los tres LBDs.

Muestra	Espín	comp ^a	%	g_1	g_2	g_3	V/Δ^b	Δ/λ^c
<i>D. melanogaster</i>	1/2	E1	~45	2.54	2.26	1.87	0.75	5.02
	1/2	E3	~55	2.33	2.26	2.04	1.19	6.92
<i>B. mori</i>	1/2	E1	~30	2.54	2.26	1.87	0.75	5.02
	1/2	E2	~25	2.44	2.26	1.91	0.93	5.04
	1/2	E3	~45	2.33	2.26	2.04	1.19	6.92
<i>O. fasciatus</i>	5/2		~10	6.02	2.92	~2.0		
	5/2		~40	4.32	2.28	~2.0		
	1/2		~20	2.48	2.27	1.88		
	1/2		~30	2.33	2.26	2.04	1.19	6.92

^aComponentes de la señal de EPR. ^bRombicidad. ^cCampo tetragonal.

4. El LBD de E75 de *O. fasciatus* une el grupo hemo covalentemente.

Analizamos mediante HPLC los perfiles de elución de los LBDs de E75 de *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori*, para lo que aplicamos cada una de ellas en una columna de fase reversa Ultrasphere C18 en condiciones ácidas, que propician la disociación del hemo siempre y cuando no esté unido covalentemente. La elución se llevó a cabo con un gradiente de acetonitrilo (con ácido trifluoroacético al 0.1%) y la detección a 400 nm mostró que el tiempo de retención del hemo libre era de ~42 min (Figura 12A). Mientras que la mayor parte del hemo de *D. melanogaster* y *B. mori* eluye como hemo libre y la cadena polipeptídica lo hace a mayores concentraciones de acetonitrilo (detección a 214 nm), la mayor parte del hemo de *O. fasciatus* aparece asociado covalentemente a la proteína, pues los picos correspondientes al hemo (detección a 400 nm) y a la cadena polipeptídica (detección a 214 nm) solapan (Figura 12B, C and D). Así pues, el grupo hemo del LBD de E75 de *O. fasciatus* no sólo posee características espectroscópicas y de unión de •NO diferentes, sino que además está unido covalentemente a la proteína.

5. Espectros de piridina hemocromo de los LBDs de E75 de los tres insectos.

Si bien la formación de piridina hemocromo es un método comunmente empleado para la determinación de la concentración de holoproteína en hemoproteínas, también resulta útil para determinar si el grupo prostético que une la proteína es hemo *a*, hemo *b* o hemo *c*. Como cabía esperar, los espectros de piridina hemocromo obtenidos para los LBDs de E75 de *D. melanogaster* y *B. mori* E75

muestran un máximo a 556 nm, característico de hemo *b* (Berry y Trumpower, 1987), mientras que la formación del complejo piridina hemocromo en el caso del LBD de E75 de *O. fasciatus* presenta el máximo a 551 nm (Figura 13). Su espectro recuerda al espectro de piridina hemocromo observado en el caso del citocromo *c*, que tiene hemo *c* unido covalentemente (Berry y Trumpower, 1987).

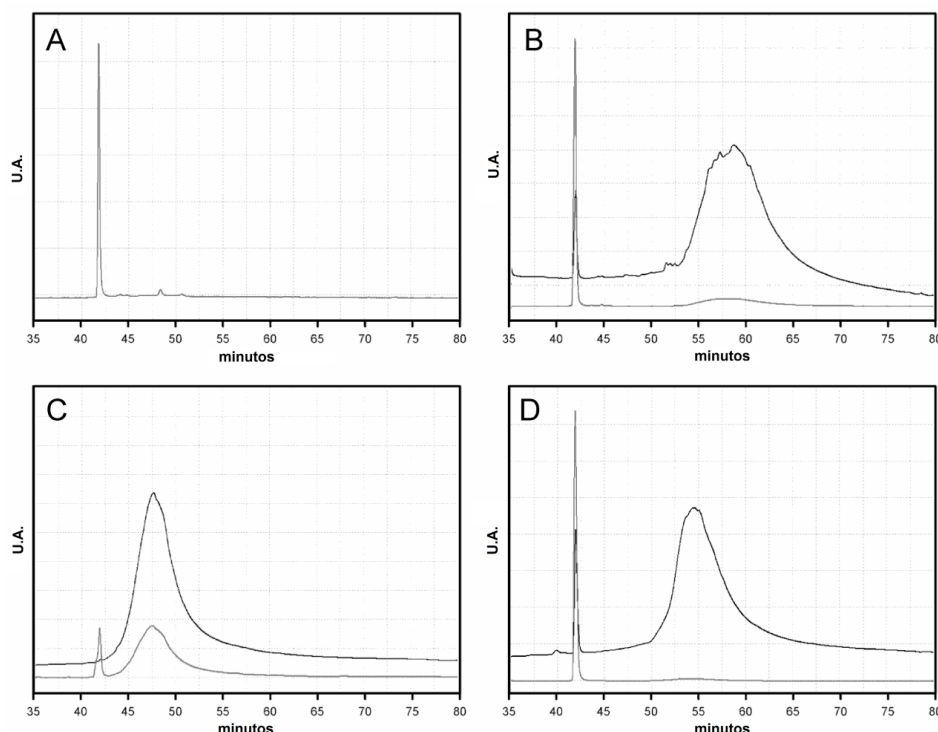


Figura 12. Análisis de los LBDs de E75 purificados mediante HPLC en columna de fase reversa Beckman Coulter Ultrasphere C18 en condiciones ácidas. La elución del hemo (trazo inferior) se determinó a 400 nm mientras que la de la cadena polipeptídica (trazo superior) se detectó a 214 nm. Se empleó un gradiente del 25 al 80% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1%. Se aplicó una solución de hemina (A) como control del tiempo de elución del hemo libre, así como los LBDs de E75 de *Dr. melanogaster* (B), *O. fasciatus* (C) y *B. mori* (D).

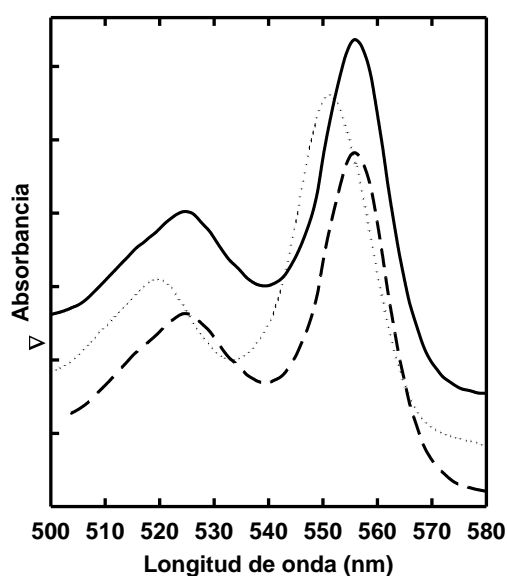


Figura 13. Espectros de piridina hemocromo de los LBDs de E75 de los tres insectos. Los LBDs de E75 de *D. melanogaster* (línea continua), *O. fasciatus* (línea punteada) y *B. mori* (trazo discontinuo) se hicieron reaccionar con una solución de piridina tal y como se ha descrito en el apartado de Métodos y se registraron los espectros de diferencia entre 500 y 580 nm. Los espectros se han desplazado verticalmente para facilitar la lectura.

6. Análisis proteómico del LBD de E75 de *Oncopeltus fasciatus*.

El análisis mediante espectrometría de masas de proteínas que tienen el grupo hemo covalentemente unido, en ocasiones permite determinar qué aminoácido está implicado en la unión, siempre y cuando la digestión proteolítica no altere la integridad de los hemopéptidos. Con el objetivo de determinar qué aminoácido o aminoácidos estaban implicados en la unión covalente del grupo hemo, el LBD de E75 de *O. fasciatus* purificado se sometió a digestión con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En total se identificaron 21 péptidos que cubrían en gran medida la secuencia del LBD, siete de los cuales estaban oxidados en residuos de metionina (Figura 14). Desafortunadamente, no fuimos capaces de identificar masas que pudieran ser asignadas a hemopéptidos con una ganancia de masa de 616 o 633 Da sobre el tamaño de los péptidos estimado tras la digestión proteolítica con tripsina.

A continuación se llevó a cabo la digestión proteolítica con tripsina del LBD de *O. fasciatus* y se aplicó el producto de la digestión en la columna de fase reversa Beckman Coulter Ultrasphere C18 en el HPLC. Se recogieron aquellas fracciones en las que los péptidos eluidos (siguiendo la detección a 214 nm) también absorbieran a 400 nm, ya que se trataría así de hemopéptidos, se concentraron y analizaron mediante espectrometría de masas (espectros MS), y a continuación, se fragmentaron los picos mayoritarios (espectros MS/MS). Se detectaron péptidos de 1474.88 Da y 1697.91 Da que, tras su fragmentación dieron espectros de MS/MS consistentes con la secuencia ²⁴⁰FLMDSMFDAER²⁵¹ (que tendría una masa de 1508.87 Da) en la que la Met245 había perdido 34 Da o ganado 189 Da, respectivamente. Estos resultados apuntan a que el grupo hemo puede estar unido a la cadena polipeptídica del LBD de E75 de *O. fasciatus* a través de un enlace vinil-sulfonio con la metionina de forma similar a como ocurre en la mieloperoxidasa (Fiedler et al., 2000; Kooter et al., 1999), o bien mediante un enlace etil-sulfonio con la metionina como ocurre en el mutante Ser160Met de la ascorbato peroxidasa (Metcalf et al., 2004). De esa forma, la fragmentación de la cadena lateral de la Met245 tras la hidrólisis con tripsina daría un péptido ²⁴⁰FLMDSMFDAER²⁵¹ con una pérdida de masa de 34 Da. E igualmente el péptido ²⁴⁰FLMDSMFDAER²⁵¹ con una ganancia de masa de 189 Da en la Met245 probablemente se obtenga debido a que un fragmento del hemo permanezca unido a la cadena lateral del aminoácido.

Dado que no existe información atómica en el caso de los LBDs de E75, estudiamos la posición de la Met486 en la estructura cristalina de su ortólogo en mamíferos Rev-erbβ obtenida recientemente (Pardee et al., 2009). Como se observa en la figura 6, la Met486 de Rev-erbβ sería equivalente a la Met245 de *O. fasciatus* y ambas estarían situadas en la hélice α 7 con el átomo de azufre muy próximo a uno de los grupos vinilo del hemo (Figura 15), lo que refuerza los datos de espectrometría de masas que parecen indicar que la cadena lateral de la Met245 podría estar implicada en uno de los enlaces covalentes con el grupo hemo. El hecho de que tanto en las proteínas de *D. melanogaster* como de *B.*

mori tengan un treonina en dicha posición equivalente de la hélice α 7 (Figura 6), supone un apoyo más para poder afirmar que el grupo hemo está unido covalentemente a la Met245 en el LBD de E75 de *O. fasciatus*.

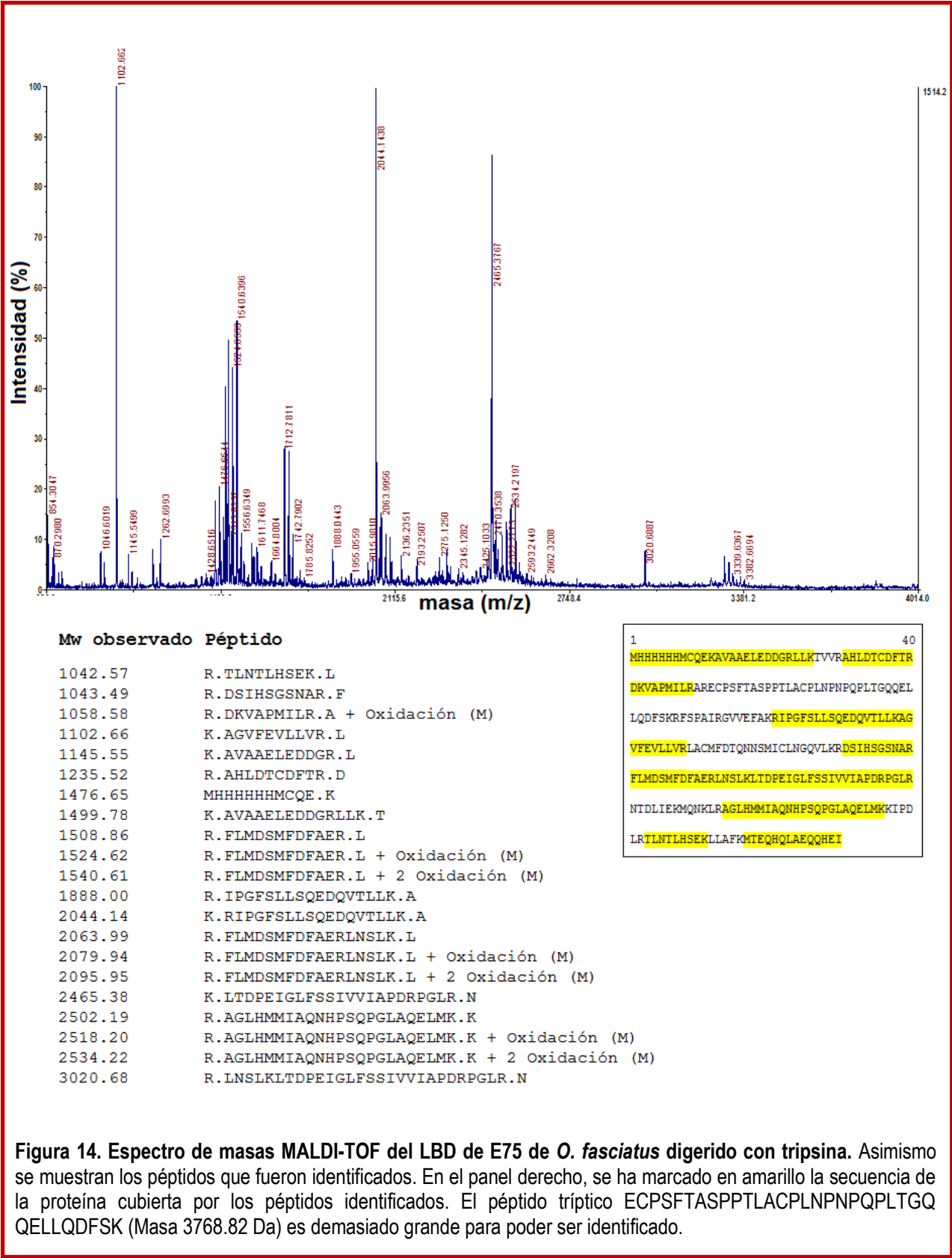


Figura 14. Espectro de masas MALDI-TOF del LBD de E75 de *O. fasciatus* digerido con tripsina. Asimismo se muestran los péptidos que fueron identificados. En el panel derecho, se ha marcado en amarillo la secuencia de la proteína cubierta por los péptidos identificados. El péptido tríptico ECPSFTASPTLACPLNPNPQPLTGQ QELLQDFSK (Masa 3768.82 Da) es demasiado grande para poder ser identificado.

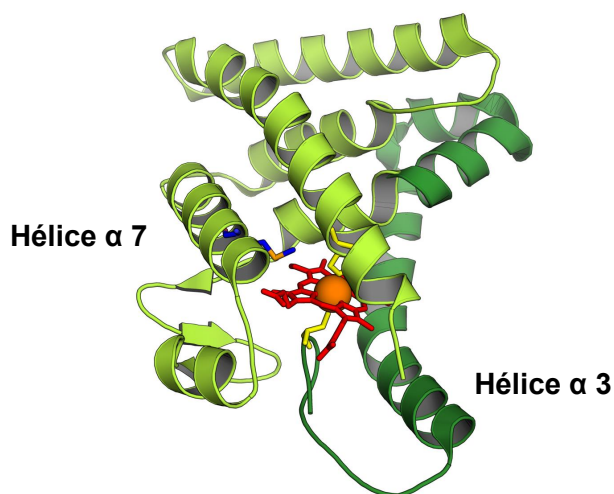


Figura 15. Representación en cintas con Pymol (www.pymol.org) de la estructura cristalina de Rev-erb β con hemo unido ((Pardee et al., 2009), PDB 3CQV). Los ligandos que se coordinan con el hierro del hemo son la Cys384 (antes de la hélice α 3) y la His568 (en la hélice α 11), ambos pintados en amarillo. Las hélices α 1 y 2 (N-terminales) no están presentes en la estructura cristalina (ver Figura 6). La mitad N-terminal de la cadena polipeptídica está coloreada en verde oscuro mientras que la mitad C-terminal está coloreada en verde claro. El límite entre ambas partes de la molécula lo componen los residuos TLLKAG (presentes tanto en la secuencia de *D. melanogaster* como en la de *O. fasciatus*), situados en la hélice α 5. Estos aminoácidos constituyen el nexo de unión para las quimeras *Dros-Onc* y *Onc-Dros*. Se indica la posición de la Met486 en la hélice α 7, próxima a uno de los grupos vinilos del hemo. Teniendo en cuenta la homología entre los LBDs de E75 de los insectos y su Rev-erb β humano, la Met245 de LBD de E75 de *O. fasciatus* (genebank ABP02025.1) estaría situada en una posición equivalente a la Met486 de Rev-erb β .

Además de la digestión con tripsina, se llevó a cabo la digestión parcial del LBD de E75 purificado con otras proteasas como pronasa o proteinasa K, seguido de su aplicación en el HPLC y recogida de lo hemopéptidos (Figura 16). Desafortunadamente, el análisis MS/MS no nos permitió identificar uniones covalentes adicionales entre el hemo y la proteína.

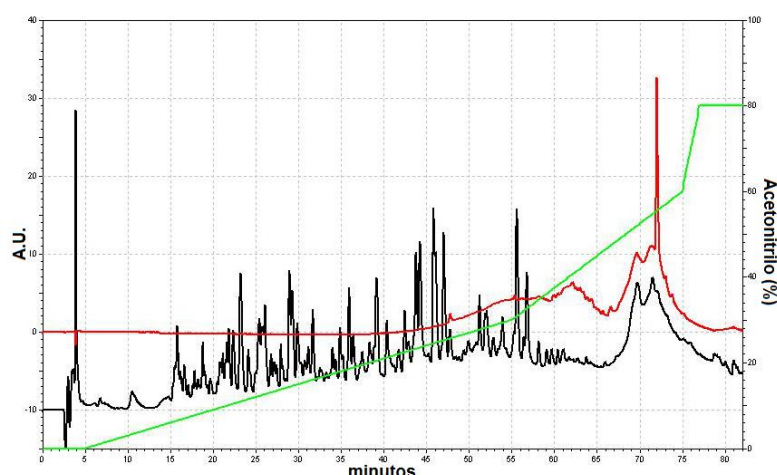


Figura 16. Perfil de elución de HPLC tras la aplicación del LBD de E75 de *O. fasciatus* digerido con **proteínasa K**. El LBD de E75 de *O. fasciatus* se digirió con proteinasa K durante 20 minutos y se aplicó en una columna de 250 x 4.6-mm de fase reversa Ultrasphere C18 de Beckman Coulter. En negro se muestra la detección a 214 nm y en rojo a 400 nm. El gradiente de acetónitrilo se dibujado en verde. Entre 68 y 72 minutos eluyen varios hemopéptidos. El hemo libre eluye a 72 minutos.

7. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de *O. fasciatus* E75 LBD en la cepa de *E.coli* RP523 deficiente en la biosíntesis de hemo.

Para explorar la posibilidad de que fuera uno o ambos grupos vinilo del hemo los que estuvieran implicados en la unión covalente con la proteína, se adoptó como estrategia llevar a cabo la expresión del LBD de E75 *O. fasciatus* en una cepa de *E. coli* deficiente en la biosíntesis de hemo y adicionar un análogo de porfirina al medio de cultivo que permitiera la purificación de la hemoproteína sustituida con un análogo del hemo de interés, que finalmente pudiera ser comparado con la proteína silvestre que une Fe(III) protoporfirina IX (Tejero et al., 2011; Woodward et al., 2007).

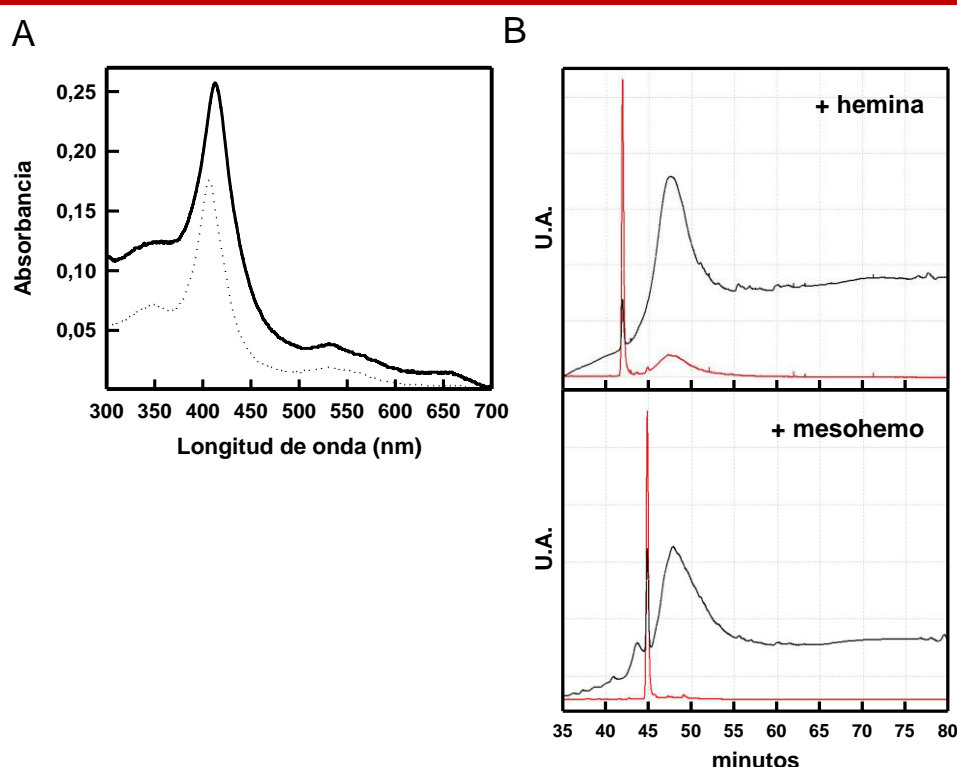


Figura 17. Caracterización espectroscópica y HPLC del LBD de E75 de *Oncopeltus fasciatus* expresado de forma recombinante en la cepa RP523 deficiente en la síntesis de hemo. (A) Espectros de absorción UV/visible (300-700 nm) del LBD de E75 de *O. fasciatus* a concentración ~24 μ M, purificado de bacterias suplementadas con Fe(III) protoporfirina IX (hemina) (línea continua) o con Fe(III) mesoporfirina IX (línea punteada). (B) Los perfiles de elución de HPLC muestran la detección a 214 nm (línea negra) y a 400 nm (línea roja). Panel superior: perfil de elución del LBD de E75 de *O. fasciatus* purificado de bacterias suplementadas con Fe(III) protoporfirina IX (hemina). Panel inferior: perfil de elución del LBD de E75 de *O. fasciatus* purificado de bacterias suplementadas con Fe(III) mesoporfirina IX. El hemo libre eluye a ~42 ml y la Fe(III) mesoporfirina IX eluye a ~45 ml.

Se creció un cultivo de bacterias de *E. coli* RP523 transformadas con el plásmido de expresión para el LBD de E75 de *O. fasciatus* E75 LBD en presencia de Fe(III) mesohemo, un derivado del hemo en el que los grupos vinilo han sido sustituidos por grupos etilo. En paralelo y como control, la proteína se expresó en la misma cepa en presencia de Fe(III) protoporfirina IX (hemina). La purificación del LBD de E75 *O. fasciatus* con Fe(III) protoporfirina IX unido muestra que el grupo prostético se incorpora

satisfactoriamente y, al igual que la proteína silvestre expresada en la cepa de *E. coli* BL21, el pico del Soret presenta un máximo centrado a 413 nm (Figura 17A). Además, la posición de las bandas α/β y de la banda CT1 no difiere de la observada en el espectro de *O. fasciatus* expresada en BL21 (Figura 9A). Sin embargo, el LBD de E75 de *O. fasciatus* sustituido con mesohemo muestra ciertos cambios espectrales: un afilado Soret desplazado hacia el azul con el máximo a 406 nm, la ausencia completa de la banda CT1 y una disminución en la incorporación de hemo (incorpora aproximadamente el 69% comparado con la proteína con Fe(III) protoporfirina IX unida).

El análisis de ambas proteínas mediante su aplicación en el HPLC muestra que en el LBD de E75 de *O. fasciatus* expresado en la cepa RP523 y suplementado con Fe(III) protoporfirina IX, el 51% del hemo permanece covalentemente unido a la proteína (Figura 17B, panel superior), lo que claramente contrasta con el caso del LBD de E75 de *O. fasciatus* expresado en la cepa RP523 y suplementado con Fe(III) mesoporfirina IX, que es completamente incapaz de unir covalentemente el grupo hemo de modo que el 100% del hemo se detecta antes de la elución de la cadena polipeptídica (Figura 17B, panel inferior). La posición de ese pico es consistente con el perfil de elución de Fe(III) mesoporfirina IX libre, que se aplicó como control para determinar su tiempo de elución y que muestra un pico afilado a 45 minutos (datos no mostrados).

En definitiva, estos resultados apoyan la conclusión de que la unión covalente del hemo en el LBD de E75 de *O. fasciatus* no es un artefacto que ocurra durante el proceso de expresión o de purificación, es pues una unión natural y claramente establece que son los grupos vinilos los que están implicados en la unión covalente.

8. Caracterización de las proteínas quimera *Dros-Onc* y *Onc-Dros*.

Si se compara la secuencia de aminoácidos de los LBDs de E75 de los tres insectos la similitud de secuencia es muy alta (Figura 6), de modo que deben ser sólo unos pocos residuos presentes en la isoforma de *O. fasciatus* los responsables de sus diferentes propiedades espectroscópicas y de la unión covalente del hemo a la proteína. Con esto en mente diseñamos dos proteínas quimera para los LBDs de E75: *D. melanogaster*-*O. fasciatus* (*Dros-Onc*) y *O. fasciatus*-*D. melanogaster* (*Onc-Dros*) (Figura 7).

Dado que entre diversas proteínas E75 los residuos de la hélice α 5 son muy similares, escogimos la secuencia conservada TLLKAG, idéntica en *D. melanogaster* y *O. fasciatus*, como fragmento de conexión entre las secuencias de ambas especies. En la Figura 18A se muestran los espectros de absorción en estado férrico de las proteínas quimera *Dros-Onc* y *Onc-Dros*. En ambos casos, el pico del Soret aparece a 422 nm, longitud de onda que está más cerca de la del Soret del LBD de E75 de *D. melanogaster* silvestre (máximo a 424 nm) que de la del LBD de E75 de *O. fasciatus* (415 nm). Sin embargo, la quimera *Onc-Dros* muestra una banda β clara a 537 nm junto con una banda α pequeña a 574 nm, seguido de una banda CT1 bien definida a 655 nm, mientras que la quimera *Dros-Onc* muestra

una banda β clara a 543 nm junto con una pequeña banda α a 574 nm, seguida de una débil pero distinguible banda CT1 a 655 nm.

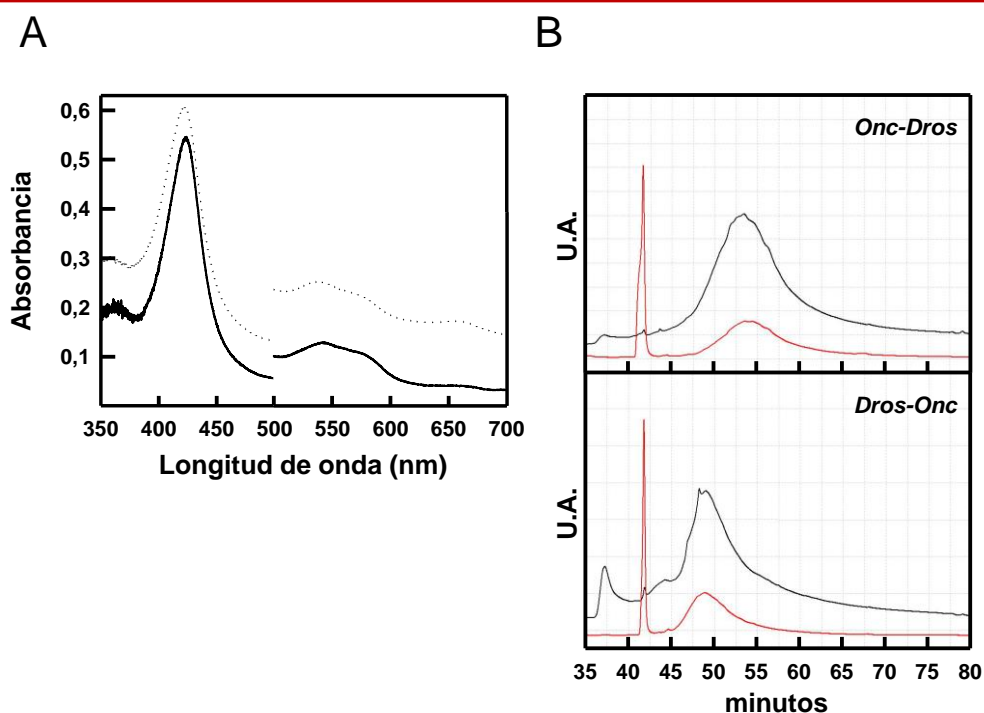


Figura 18. Caracterización espectroscópica y HPLC de las quimeras de LBD de E75 DE *Drosophila melanogaster*-*Oncopeltus fasciatus* (*Dros-Onc* y *Onc-Dros*). Se llevó a cabo la clonación y expresión recombinante de las proteínas quimeras de *D. melanogaster*-*O. fasciatus* (en la Figura 7 se muestran sus secuencias). (A) Espectros de absorción UV/visible (350-700 nm) de las quimeras *Dros-Onc* (línea continua) y *Onc-Dros* (línea punteada) en estado férrico. La región de 500 a 700 nm ha sido amplificada para facilitar la lectura. (B) Perfiles de elución de HPLC de las quimeras *Onc-Dros* (panel superior) y *Dros-Onc* (panel inferior); detección a 214 nm (línea negra) y a 400 nm (línea roja). El hemo libre eluye a ~42 ml.

Así pues, estos espectros de absorción comparten componentes de los espectros de ambas proteínas silvestres de *O. fasciatus* y *D. melanogaster* aunque la banda CT1 a 655 nm parece deberse a la interacción del grupo hemo con aminoácidos presentes en la parte N-terminal del LBD de E75 de *O. fasciatus*. El espectro del LBD de E75 de *D. melanogaster* en estado férrico muestra bandas α/β a 574 y 543 nm, respectivamente, ambas presentes en las construcciones quimera, aunque con un ligero desplazamiento hacia el azul de la banda β . Por otro lado, el espectro del LBD de E75 de *O. fasciatus* en estado férrico muestra una banda β clara a 532 nm junto con una banda CT1 a 655 nm; esta banda indicativa de configuración de alto espín es claramente visible en la quimera *Onc-Dros* y en menor medida en la quimera *Dros-Onc* (Figura 19).

El análisis mediante HPLC de las dos proteínas *Onc-Dros* y *Dros-Onc* reveló que en ambas quimeras una cantidad significativa de hemo permanece unida covalentemente a la proteína (Figura 18B). Esto sugiere que un enlace covalente con el hemo se mantienen en cada una de las quimeras y refuerza la hipótesis de que el hemo está unido covalentemente al LBD de E75 de *O. fasciatus* silvestre a través de al menos dos enlaces covalentes, uno con un aminoácido posicionado en la mitad N-terminal

de la cadena polipeptídica y el otro en la mitad C-terminal. El hecho de que la sustitución con mesohemo lleve a una ausencia total de unión covalente del hemo, claramente establece que son ambos grupos vinilos los que están implicados en la unión covalente. La cuantificación de la proporción de hemo libre/hemo unido en las diversas hemoproteínas purificadas revela que ambas quimeras unen el hemo de covalentemente de forma parcial aunque en menor medida que la proteína silvestre de *O. fasciatus* (Tabla 3).

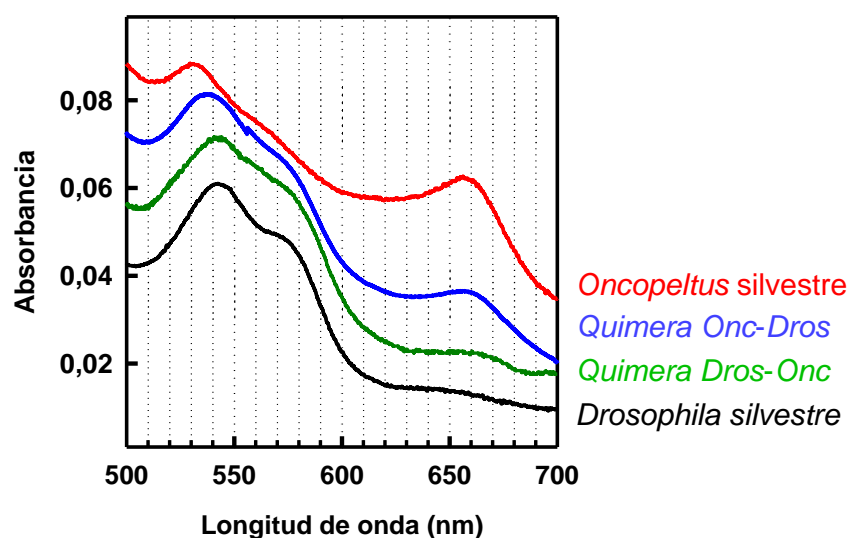


Figura 19. Espectros de absorción de los LBDs de E75 de *Drosophila melanogaster*, *Oncopeltus fasciatus* y de la quimeras de *D. melanogaster*-*O. fasciatus* en estado férrico. El espectro de absorción del LBD de E75 de *D. melanogaster* silvestre (línea negra), muestra bandas α/β a 574 y 543 nm respectivamente, mientras que el LBD de E75 de *O. fasciatus* (línea roja) muestra una clara banda β a 532 nm junto con una banda CT1 a 655 nm (componente de hierro en configuración de alto espín). La quimera *Dros-Onc* (línea verde) tiene una clara banda β a 543 nm junto con una pequeña banda α a 574 nm, seguida de una débil pero discernible banda CT1 a 655 nm. La quimera *Onc-Dros* (línea azul) muestra una clara banda β a 537 nm junto con una pequeña banda α a 574 nm, seguida de una clara banda CT1 a 655 nm. Los espectros han sido desplazados verticalmente.

Tabla 3. Cuantificación de la cantidad de hemo no unido covalentemente a la proteína calculado tras la integración del área de los picos detectados a 400 nm en el HPLC.

Cantidad de hemo no unido covalentemente al LBD de E75 (% \pm Error std):	
<i>Drosophila melanogaster</i>	80.0 \pm 2.1
<i>Bombyx mori</i>	91.5 \pm 3.9
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	8.9 \pm 1.3
Quimera <i>Dros-Onc</i>	32.5 \pm 0.1
Quimera <i>Onc-Dros</i>	35.0 \pm 4.3
<i>O. fasciatus</i> Glu158Lys	10.9 \pm 0.4
<i>O. fasciatus</i> Met245Thr	18.0 \pm 0.2
<i>Blattella germanica</i>	16.9 \pm 0.7

9. Caracterización de los mutantes Glu158Lys y Met245Thr del LBD de E75 de *O. fasciatus*.

Dada la posibilidad de que uno de los aminoácidos implicados en la unión covalente del hemo fuera la Met245, dicho aminoácido se sustituyó por treonina ya que en las secuencias de *D. melanogaster* y *B. mori* aparece una treonina en esta posición (Figura 6). La caracterización espectroscópica del mutante Met245Thr del LBD de E75 de *O. fasciatus* muestra el Soret con un máximo a 413 nm, una banda α casi inexistente y una banda β centrada a 532 nm. Además, este mutante puntual presenta una clara banda CT1 a 655 nm (Figura 20A), en concordancia con la observación anterior de que la aparición de esta banda es resultado de la interacción del hemo con aminoácidos presentes en la mitad N-terminal del LBD de E75 de *O. fasciatus*. El análisis por HPLC de este mutante muestra que aproximadamente un 18% del hemo total eluye como hemo libre, una cantidad dos veces mayor que en la proteína silvestre (Tabla 3).

Así pues, la sustitución de la Met245 no genera cambios importantes en las propiedades espectroscópicas de la hemoproteína en comparación con la proteína silvestre, si bien dicha mutación aumenta ligeramente la cantidad de hemo que no se une covalentemente a la proteína.

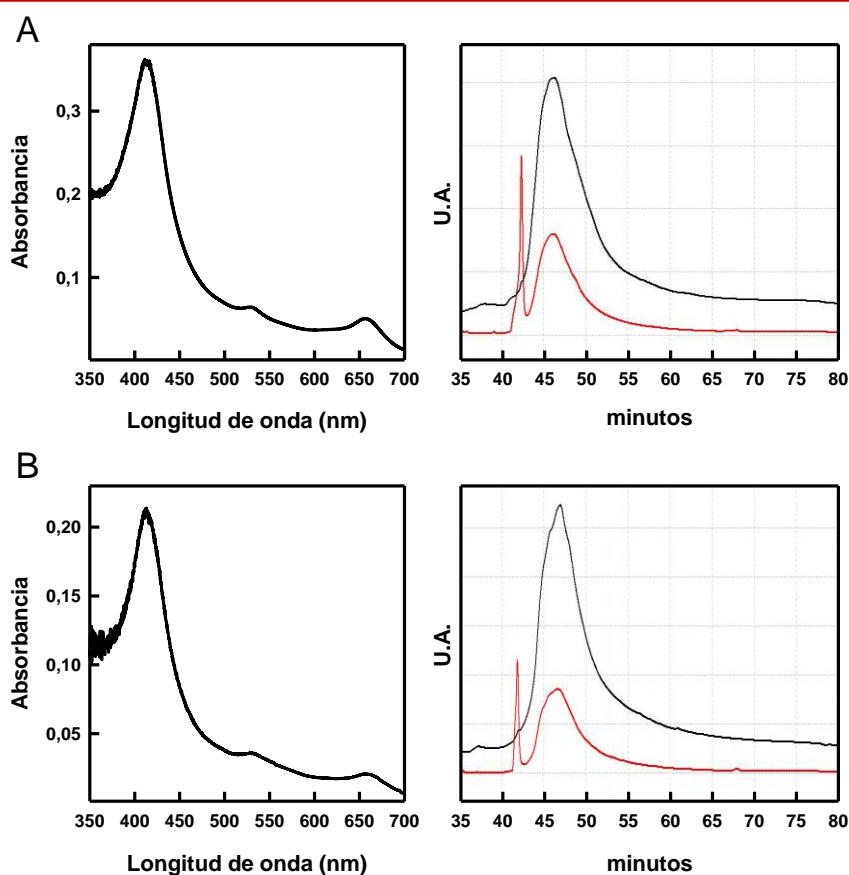


Figura 20. Caracterización espectroscópica y HPLC de los mutantes puntuales Met245Thr y Glu158Lys del LBD de E75 de *O. fasciatus*. Se muestran los espectros de absorción de 350 a 700 nm (paneles de la izquierda) así como los perfiles de elución del HPLC (paneles de la derecha, detección a 214 nm en negro y a 400 nm en rojo), de los mutantes puntuales del LBD de E75 de *O. fasciatus* Met245Thr (A) y Glu158Lys (B). El hemo libre eluye a ~42 ml.

Nuestros datos sugieren que al menos dos aminoácidos están implicados en la unión covalente del grupo hemo y que las propiedades espectroscópicas del LBD de E75 de *O. fasciatus* están determinadas principalmente por los ligandos del hierro proximal y distal así como por otros aminoácidos presentes en el entorno del hemo, más que por la unión covalente del grupo hemo a la cadena polipeptídica.

En el caso de la mieloperoxidasa existe un enlace vinil-sulfonio entre el grupo vinilo del hemo y un residuo de metionina, pero otras proteínas como algunos citocromos P450 de la familia CYP4A unen el hemo a través de la cadena lateral de residuos de ácido glutámico (Colas y Ortiz de Montellano, 2003). Por este motivo y con el objetivo de tratar de identificar el segundo aminoácido implicado en la formación del enlace covalente con el hemo, clonamos un segundo mutante puntual Glu158Lys ya que este ácido glutámico además de estar ausente en las isoformas de *D. melanogaster* y *B. mori*, se predice que está posicionado en el extremo N-terminal de la hélice α 3 próximo al grupo hemo (Figura 15). Sin embargo, las propiedades espectroscópicas y el perfil de elución de HPLC de este mutante Glu158Lys, son muy similares a los mostrados por la proteína silvestre (Figura 20B).

10. Expresión recombinante y purificación del LBD de E75 de *Blattella germanica*.

El siguiente objetivo fue tratar de averiguar si las propiedades espectroscópicas y la unión covalente del grupo hemo a la proteína eran características propias del LBD de E75 de *O. fasciatus*, o bien eran compartidas con receptores nucleares E75 de otros insectos. La comparación de la secuencia del LBD de E75 de diversos insectos, muestra que el LBD de E75 de la cucaracha alemana (*Blattella germanica*) presenta una gran homología de secuencia con la isoforma de *O. fasciatus* (Figura 6). Así pues, se llevó a cabo la clonación, expresión en *E.coli* y purificación del LBD de E75 de *B. germanica* (aa 148-402). Esta isoforma también se purifica como hemoproteína en estado férrico y presenta una coloración marrón muy parecida a la de *O. fasciatus*. Su espectro de absorción presenta el pico del Soret a 415 nm, la banda α casi inexistente, la banda β centrada a 533 nm y la banda CT1 a 655 nm (Figura 21A). Así pues, sus propiedades espectroscópicas son claramente distintas de las de *D. melanogaster* y *B. mori*, pero casi idénticas a las del LBD de E75 de *O. fasciatus* (Figura 9). Su perfil de elución tras su aplicación en el HPLC (Figura 21B) muestra que, en estas condiciones ácidas que favorecen la disociación del hemo siempre que no esté covalentemente unido, la mayor parte del hemo permanece unido a la cadena polipeptídica del LBD de E75 de *B. germanica* (Tabla 3), en concordancia con el comportamiento mostrado por la isoforma de *O. fasciatus*.

Estos resultados permiten concluir que el LBD de los receptores nucleares E75 de algunas especies tienen unido el grupo hemo de forma covalente.

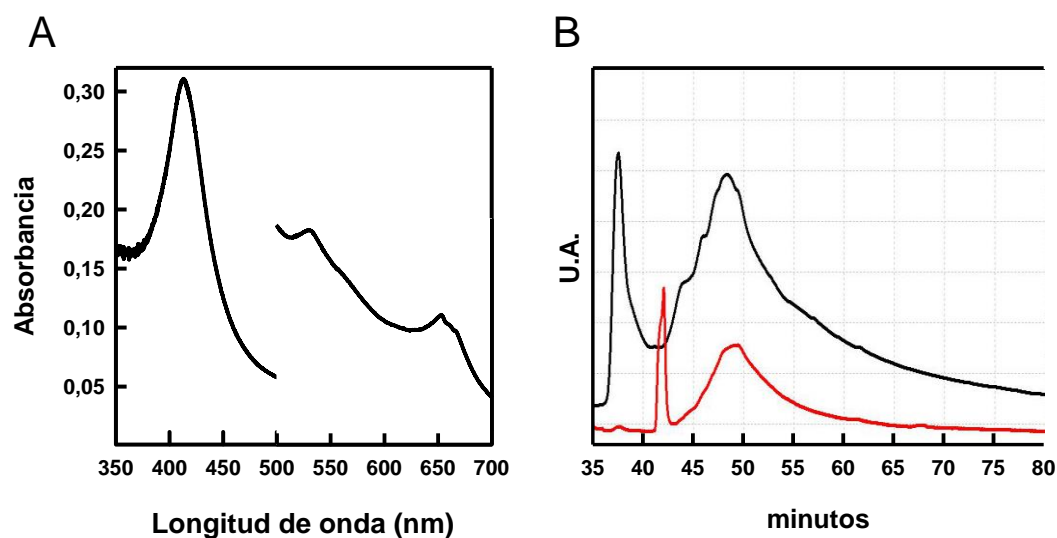


Figura 21. Caracterización espectroscópica y HPLC del LBD de E75 de *Blattella germanica*. Espectro de absorción (A) y perfil de elución del HPLC (B) del LBD de E75 de *B. germanica*. La región de 500 a 700 nm del espectro de absorción se ha magnificado para mayor claridad. Perfil de elución del HPLC con detección a 214 nm en negro y a 400 nm en rojo). El hemo libre eluye a ~42 ml.

BLOQUE 2: Obtención de cristales de los LBD de E75 de *D. melanogaster*, *B. mori* y *O. fasciatus*.

Si bien hasta el momento no se han obtenido resultados satisfactorios en los intentos de obtener cristales correspondientes a los LBD de E75 de *D. melanogaster*, *B. mori* y *O. fasciatus*, a continuación se detallan los progresos realizados. En algunas de las condiciones comerciales se observó la formación de microcristales, unas veces a temperatura ambiente y otras a 4°C. Con el objetivo de favorecer la formación de cristales de mayor tamaño, se llevó a cabo un barrido en torno a la solución precipitante original a diferentes pH o concentraciones de los componentes que resultaran más interesantes y determinantes para la formación de cristales.

Las condiciones en las que se observó la aparición de microcristales o cristales pequeños y en torno a las cuales, en los casos en que se consideró necesario, se llevó a cabo un barrido de la composición de la solución original:

A) LBD de E75 de *Bombyx mori*:

RT) a) Condición JBScreen Basic 2:D1: 18% w/v PEG 8000, MES sódico 100 mM, pH 6.5, acetato de zinc 200 mM. Se hizo un barrido de 12-14-16-18-20-22% de PEG 8000 y de acetato de zinc 50-100-150-200 mM, obteniéndose 24 nuevas condiciones.

b) Condición JBScreen Basic 1:D1: 20% v/v PEG 550 MME, Bicina 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM. Se hizo un barrido de 16-18-20-22-24-26% de PEG 550 MME y de Bicina 100 mM, pH 8.0-8.5-9.0-9.5.

c) Condición JBScreen Basic 1:A6: 30% v/v 2-metil-2,4-pentanediol, acetato de sodio 100 mM, pH 4.6, NaCl 200 mM. Se hizo un barrido de 22-24-26-28-30-32% de 2-metil-2,4-pentanediol y de acetato de sodio 100 mM, pH 4.6-5.5-6.5-7.5.

4°C) a) Condición JBScreen Basic 2:A3: 20% w/v PEG 4000, 10% v/v 2-propanol, HEPES sódico 100 mM, pH 7.5. En torno a esta condición se hizo un barrido de 16-18-20-22-24-26% de PEG 4000 y de 5-10-15-20% 2-propanol.

b) Condición JBScreen Basic 2:C3: 8% w/v PEG 8000, Tris-HCl 100 mM, pH 8.5. Se hizo un barrido de 2-4-6-8-10-12% PEG 8000 y de Tris-HCl 50 mM ó 100 mM, a pH 7.5 ó pH 8.5.

c) Condición JBScreen Basic 2:C4: 10% w/v PEG 8000, 8% v/v etilenglicol, HEPES sódico 100 mM, pH 7.5. Se hizo un barrido de 6-8-10-12-14-16% de PEG 8000 y de 4-6-8-10% etilenglicol.

d) Condición JBScreen Basic 2:D1: igual que a RT.

B) LBD de E75 de *Drosophila melanogaster*:

RT) a) Condición JBScreen Basic 3:C1: 25% v/v tert-butanol, Tris-HCl 100 mM, pH 8.5. Se hizo un barrido de 17.5-20-22.5-25-27.5-30% de tert-butanol y de Tris-HCl 100 mM, a pH 6.5-7.5-8.5-9.5.

- b) Condición JBScreen Basic 2:A2: 20% w/v PEG 4000, 20% v/v 2-propanol, citrato sódico 100 mM, pH 5.6. No se hizo barrido.
- c) Condición JBScreen Basic 1:B2: 30% v/v 2-metil-2,4-pentanediol, acetato de sodio 100 mM, pH 4.6, CaCl 20 mM. No se hizo barrido
- d) Condición JBScreen Basic 2:D1: ya descrita. No se hizo barrido.
- e) Condición JBScreen Basic 2:D2: 20% w/v PEG 8000, dihidrógeno fosfato de potasio 50 mM. No se hizo barrido.

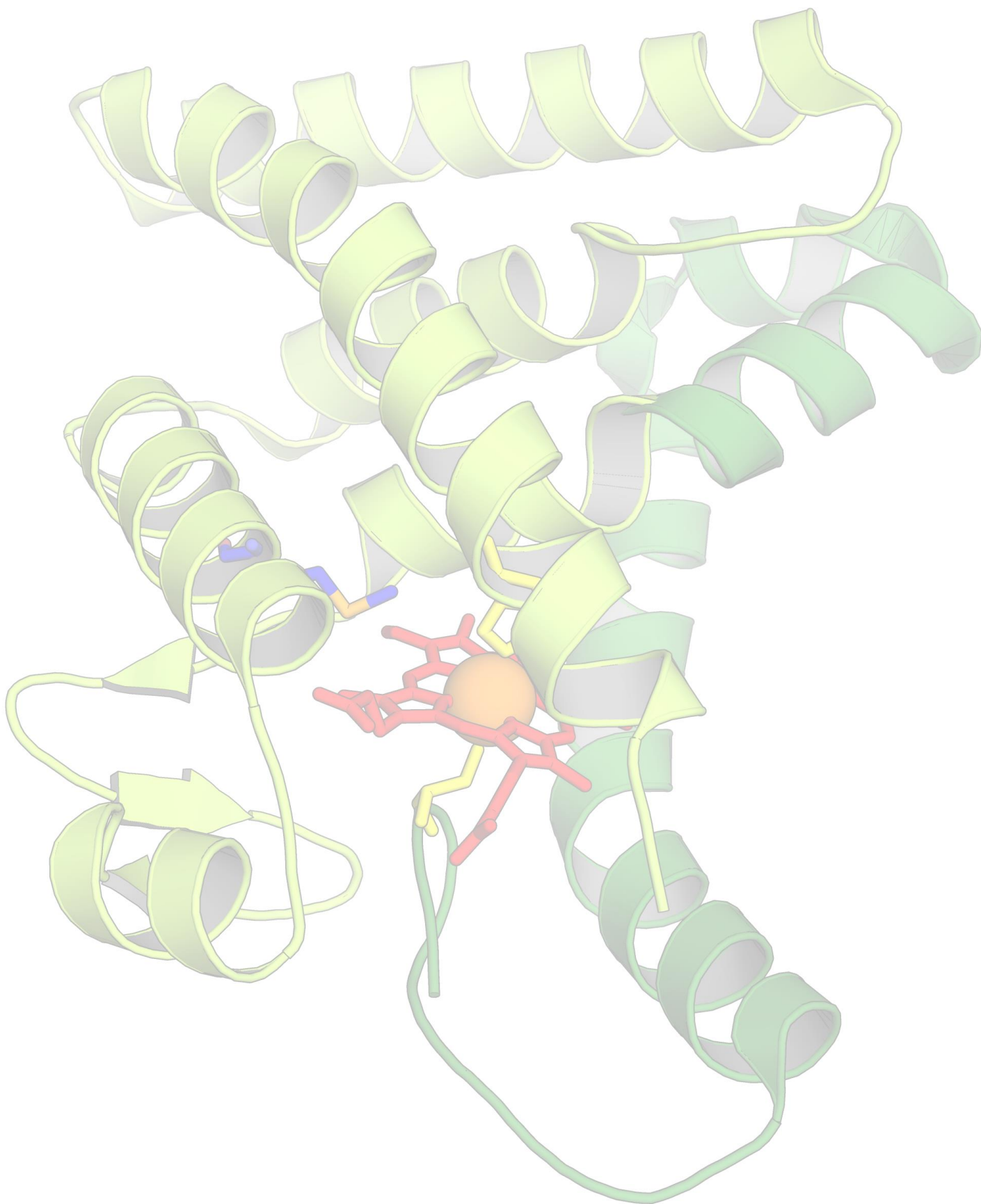
4°C) a) Condición JBScreen Basic 1:D1: ya descrita. Se hizo el barrido comentado. Varias de las nuevas condiciones dieron lugar a la formación de nuevos posibles cristales:

- 20% v/v PEG 550 MME, Bicina 100 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM.
- 22% v/v PEG 550 MME, Bicina 100 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM.
- 24% v/v PEG 550 MME, Bicina 100 mM, pH 9.0, NaCl 100 mM.

C) LBD de E75 de *Oncopeltus fasciatus*:

- RT)** a) Condición JBScreen Basic 1:B6: 70% v/v 2-metil-2,4-pentanediol, HEPES sódico 100 mM, pH 7.5. No se hizo barrido.
- b) Condición JBScreen Basic 2:D1: ya descrita. No se hizo barrido.
- c) Condición JBScreen Basic 2:D5: 30% w/v PEG 8000, sulfato de amonio 200 mM. No se hizo barrido.

Los posibles cristales de proteínas observados en estas condiciones, se pescaron como se ha descrito en el apartado de Métodos y se analizó su patrón de difracción en el difractómetro, si bien no se obtuvo ningún resultado positivo. Algunas imágenes estaban vacías, en otras se observó un patrón de difracción correspondiente a cristales de sal, pero en ningún caso se observó un patrón que pudiera ser de proteína.



DISCUSIÓN

En metazoos, los receptores nucleares han sido definidos de forma clásica como factores de transcripción activados por ligando que permiten la regulación de genes diana por pequeñas moléculas lipofílicas como hormonas (esteroides, hormonas tiroideas), morfógenos (ácido retinoico) y componentes de la dieta (ácidos grasos) (Fahrbach et al., 2012; Markov y Laudet, 2011). La mayoría de los receptores nucleares tienen dominios modulares diferenciados denominados (empezando por el extremo N-terminal) como A/B, C, D, E y F (Escriva et al., 2004; Fahrbach et al., 2012). El dominio C es el dominio de unión a DNA (DBD) y posee residuos conservados de cisteína que estabilizan varios dedos de zinc. El dominio E, estructuralmente conservado, es el dominio de unión a ligando (LBD) y permite a los receptores nucleares funcionar como reguladores de la transcripción dependientes de ligando. El LBD actúa como interruptor molecular ya que tras la unión del ligando sufre cambios conformacionales, que afectan a la localización subcelular, dimerización, unión al DNA, unión de proteínas coactivadoras y/o a la actividad transcripcional (Glass y Rosenfeld, 2000).

El genoma del insecto *D. melanogaster* codifica sólo para 18 receptores nucleares que tengan tanto el dominio de unión a DNA funcional como el LBD (King-Jones y Thummel, 2005). Pese a ser un organismo muy estudiado, muchos receptores nucleares de *D. melanogaster* permanecen huérfanos, esperando a que sus ligandos endógenos o xenobióticos sean identificados. Estudios recientes han mostrado que el grupo hemo está presente en el receptor nuclear E75 purificado de varios insectos (Reinking et al., 2005), uno más de los muchos receptores huérfanos, y que el hemo aparece asociado al LBD de E75 cuando se purifica en un sistema de expresión heterólogo (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). Posteriormente y de manera independiente, dos grupos han descubierto que Rev-erba y Rev-erbβ, los ortólogos humanos de E75 de *D. melanogaster*, también unen hemo (Pardee et al., 2009; Raghuram et al., 2007; Yin et al., 2007). La unión del hemo a estos receptores nucleares puede ser explicada asumiendo que podrían funcionar como sensores de los niveles celulares de hemo, de cambios redox o de la concentración de gases diatómicos, quizás incluso simultáneamente, regulando de esta forma la expresión de varios genes.

De hecho, se ha sugerido que el receptor nuclear E75 de *D. melanogaster* podría emplear hemo como ligando, funcionando así como sensor de hemo (Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). Esta hipótesis se ha visto reforzada por la observación de que el hemo se une a E75 con una estequiometría 1:1, la unión del hemo aumenta la estabilidad térmica de la proteína y se requiere para el correcto plegamiento y funcionamiento de E75 (Reinking et al., 2005). Sin embargo, existe una objeción a la conclusión de que el hemo se une y es liberado de E75, como haría un verdadero ligando ya que el LBD de E75 siempre se purifica saturado de hemo tras su expresión en sistemas bacterianos (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005) y ni siquiera el tratamiento con cloruro de guanidinio 5 M es capaz de hacer que E75 libere el hemo asociado (Reinking et al., 2005). Además, nosotros hemos observado que una cantidad significativa de hemo permanece unida al LBD de E75 de *D. melanogaster*

tras su aplicación en un gel PAGE-SDS, condiciones desnaturalizantes que deberían conllevar la disociación del hemo. Por el contrario, los ortólogos de mamíferos de E75 de insectos, Rev-erba y Rev-erb β , sí que parece que sean sensores de hemo ya que ambas proteínas pueden purificarse en ausencia de hemo (Pardee et al., 2009; Phelan et al., 2010). La calorimetría isotérmica de titulación puede emplearse para determinar la constante de unión de hemo tanto para apoRev-erba como para apoRev-erb β (Raghuram et al., 2007) y existen datos cristalográficos atómicos disponibles tanto para las formas apo y holo (con hemo unido) de Rev-erba (Phelan et al., 2010) y Rev-erb β (Pardee et al., 2009; Woo et al., 2007). Además, la unión de hemo promueve el reclutamiento del correpresor nuclear NCoR (*Nuclear receptor Co-Repressor*) y de histona deacetilasa (Pardee et al., 2009; Raghuram et al., 2007; Yin y Lazar, 2005), con Rev-erba reclutando HDAC3 y Rev-erb β reclutando HDAC1 (Gupta y Ragsdale, 2011), lo que conlleva la represión de sus genes diana entre ellos *Bmal1* (que codifica para BMAL1 *Brain, muscle Arnt-like protein-1*), un componente esencial de la oscilación circadiana. Además, mientras que Rev-erb β puede reprimir la transcripción de genes diana, su mutante puntual His602Phe, que no puede unir hemo, en experimentos de cotransfección no desempeña esta actividad represora transcripcional (Raghuram et al., 2007). Así pues, Rev-erb β sí que es un verdadero sensor de hemo y el hemo desempeña un papel de ligando para este receptor nuclear.

Como se ha comentado, la heterodimerización entre E75 y HR3 a través del extremo C-terminal de HR3, conlleva la represión de la actividad transcripcional desarrollada por HR3 (Reinking et al., 2005). Además, el receptor nuclear E75 de *D. melanogaster* puede detectar cambios en las condiciones redox en el sentido de que el LBD en estado ferroso (Fe(II)), pero no en estado férrico (Fe(III)), puede unirse a un péptido derivado de HR3, lo cual sugiere que la heteroasociación y consiguiente represión de la transcripción llevada a cabo por HR3 tiene lugar cuando el hierro del hemo está en estado reducido (Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005).

Además, la interacción del LBD de E75 *D. melanogaster* con gases diatómicos tanto *in vivo* como *in vitro*, está bien documentada, aunque solamente ha sido observada y caracterizada *in vivo* la unión de •NO al LBD de E75 (Caceres et al., 2011; de Rosny et al., 2006; Johnston et al., 2011; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). La unión tanto de CO como de •NO al grupo hemo en estado ferroso del LBD de E75 de *D. melanogaster* purificado, bloquea su capacidad de unirse a un péptido derivado de HR3 de modo que HR3 queda libre para llevar a cabo su actividad transcripcional, que estaba impedida por la acción represora de E75 (Reinking et al., 2005). En experimentos de transfección, HR3 por sí mismo actúa como activador transcripcional, si bien en presencia de E75 transfectado, su actividad se ve reducida de forma significativa. La adición de un donador de •NO, como el DETA-NO, a las células cotransfectadas, conlleva la formación del complejo hemo-NO en E75, lo que implica una interferencia en su asociación con HR3 y por lo tanto se rescata la actividad transcripcional de HR3 (Reinking et al., 2005). *In vivo*, la liberación de •NO por la óxido nítrico sintasa de *D. melanogaster* en la glándula

protorácica bloquea la capacidad de E75 de interferir en la actividad transcripcional mediada por HR3 (Caceres et al., 2011). La inmunoprecipitación de cromatina también muestra que el •NO inhibe el reclutamiento por E75 del correpressor SMRTER (Johnston et al., 2011).

En esta bloque de la tesis se ha caracterizado y comparado la coordinación del hemo en los dominios de unión a ligando del receptor nuclear E75 de cuatro insectos diferentes: *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Oncopeltus fasciatus* y *Blattella germanica*.

El LBD de E75 de *B. mori* presenta las mismas características espectroscópicas que la isoforma de *D. melanogaster* y su espectro de absorción UV/visible es similar al obtenido por otros grupos para el LBD de E75 de *D. melanogaster* (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005); ambas se purifican como hemoproteínas en estado férrico y de la comparación de sus características espectroscópicas con las de otras hemoproteínas que tienen por ligando axial una cisteína (tiolato), se puede concluir que el hierro está en configuración de bajo espín y su grupo hemo esta hexacoordinado con una cisteína y una histidina. La intensa y bien definida banda δ presente en el espectro es una prueba clara de la coordinación con la cisteína. Los espectros de EPR también son característicos de hemoproteínas cuyo hierro está en configuración de bajo espín y hexacoordinado con una cisteína (tiolato) en posición opuesta a un ligando neutro, como es la histidina. El hecho de que se observen varias componentes refleja que existe heterogeneidad en la coordinación del hierro, si bien todos los valores g están en el intervalo encontrado para hemoproteínas que tienen por ligando axial una cisteína (tiolato hemoproteínas), en las que el ligando cisteína determina las propiedades de EPR del hierro del hemo. El hecho de que se observen varias señales de rombicidad similar puede deberse a variaciones en la protonación o en la formación de puentes de hidrógeno de la cadena lateral de la cisteína (Pazicni, 2006), aunque no hay que descartar que pueda deberse a que en la coordinación participen dos cisteínas diferentes (de Rosny et al., 2006). Así, si bien la Cys396 y la His574 han sido asignados como ligandos axiales del hierro del hemo en el LBD de E75 de *D. melanogaster*, en este insecto los residuos Cys368, Cys385 y Cys468 también están implicados en la unión del hemo (de Rosny et al., 2006); así, la mutación de la Cys368 desestabilizaría la coordinación con el ligando His, la Cys385 si bien no es no se coordina con el hemo probablemente esté implicada en estabilizar las interacciones hemo-proteína ya que el mutante aunque presenta un espectro UV/visible y de EPR similar a la proteína silvestre incorpora menos hemo y la Cys468 podría contribuir como ligando alternativo a la Cys396. El hecho de que dos cisteínas alternativas estén implicadas en la coordinación con el hierro se ha atribuido a que en ausencia de DBD el LBD es más flexible que en el contexto de la proteína completa, y la asignación del papel de ligando natural a la Cys396 se justifica en base a que su mutante es el que presenta mayores cambios en el espectro de EPR.

Sin embargo, tanto el LBD de E75 de *O. fasciatus* como de *B. germanica* se purifican como hemoproteínas en estado férrico con el hierro del hemo en configuración de alto espín, tal como se

deduce de la aparición de la banda CT1 a 655 nm. Sus espectros de absorción son similares al de la mioglobina, cuyo hemo contiene el Fe(III) en configuración de alto espín hexacoordinado (Gonzalez et al., 2002) con una histidina y probablemente una molécula de agua. Los datos de EPR obtenidos para el LBD de E75 de *O. fasciatus* confirman que esta hemoproteína se purifica con una mezcla de componentes de alto y bajo espín.

Además, tras el análisis mediante HPLC del perfil de elución de los LBDs de E75 de los diferentes insectos en una columna de fase reversa Ultrasphere C18 en condiciones ácidas que propician la disociación del hemo siempre y cuando no esté unido covalentemente, se ha demostrado que en las isoformas de *O. fasciatus* y *B. germanica*, el grupo hemo no sólo está coordinado, sino que está unido covalentemente a la cadena lateral de al menos dos aminoácidos, por lo que se ha procedido a caracterizar dicha unión en *O. fasciatus*.

Aunque la estructura a resolución atómica del LBD de E75 de insectos no está disponible, la estructura cristalina de un fragmento triptico del LBD de su ortólogo humano Rev-erb β con hemo en su forma Fe(III) unido, muestra que el hemo se une al dominio de unión a ligando y que la Cys384 y la His568 son los ligandos axiales del hierro del hemo. Además, a la luz de la estructura cristalina de Rev-erb β con hemo unido, varios residuos situados en el extremo N-terminal de la hélice α 3 han sido propuestos como ligandos axiales del hemo “suplentes” tras cambios conformacionales (Pardee et al., 2009). Los residuos coordinados con el hierro del hemo en el LBD de Rev-erb β , Cys384 e His568, están conservados en los LBDs de E75 de los cuatro insectos: en *D. melanogaster* (Cys396, His574), en *B. mori* (Cys193, His371), en *O. fasciatus* (Cys144, His327) y en *B. germanica* (Cys204, His387) (Figura 6). Si se observa con detenimiento el alineamiento de las secuencias de la figura 6, se puede comprobar que los LBDs de E75 de *O. fasciatus* y *B. germanica* poseen cinco aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la hélice α 3 que no están presentes en las isoformas de *D. melanogaster* y *B. mori*. Como se puede observar en la figura 15, esta región del receptor nuclear se predice que está posicionada cerca del grupo hemo y por lo tanto es bastante posible que pueda establecer uno de los enlaces covalentes con el grupo hemo. Nuestros resultados indican que la Met245 de *O. fasciatus* podría también estar unida covalentemente al grupo hemo. La ausencia de cambios espectroscópicos importantes en el mutante puntual Met245Thr, probablemente refleje la reducción del grupo vinilo del hemo y la formación de un enlace etilo entre la proteína, a través de la Met245 y el hemo. Esto sería análogo al enlace encontrado en las hemoglobinas de cianobacterias (Vu et al., 2004a; Vu et al., 2004b) y en el mutante puntual Ser160Met de la ascorbato peroxidasa (Metcalf et al., 2004), pero diferente del enlace vinil-sulfonio de la mieloperoxidasa (Fiedler et al., 2000; Kooter et al., 1999). Si la adición del azufre de la metionina al grupo vinilo da lugar a un aducto saturado, sin regeneración del doble enlace, la unión resultante sería porfirina-CH₂-CH₂-S⁺(Me)Cys o porfirina-CHX-CH₂-S⁺(Me)Cys (Figura 22). Esta adición perturbaría el cromóforo mucho menos ya que el sulfonio no estaría conjugado con el anillo de porfirina del hemo y explicaría la

ausencia de cambios en el espectro de absorción UV/visible del mutante Met245Thr de *Oncopeltus fasciatus*. Un ejemplo de esta adición sería el demostrado por el grupo de Emma Raven (Metcalf et al., 2004) que introducen una metionina cerca del hemo en una peroxidasa lo que provoca la formación de un enlace covalente con este aminoácido. Aun así no se puede afirmar cual es la estructura del enlace ya que a las dos propuestas citadas anteriormente, otras que también implican la saturación del grupo vinilo podrían ser porfirina-CH(OH)-CH₂-S⁺(Me)Cys como propone el grupo de Emma Raven en su caso (Metcalf et al., 2004), o bien X podría ser incluso un hidrógeno si bien esto genera algunas cuestiones mecanísticas. Las adiciones a los grupos vinilo del hemo pueden ocurrir en ausencia de peróxido, o al menos en proteínas que no producen peróxido. Así, por ejemplo una His se une al grupo vinilo del hemo en una hemoglobina truncada de *Synechococcus* (Scott et al., 2002; Vu et al., 2004b).

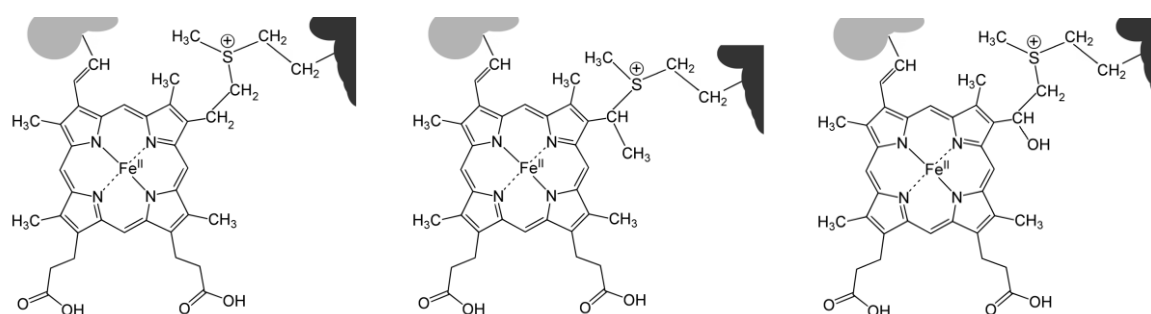


Figura 22. Posibles aductos resultantes de la formación del enlace covalente entre un grupo vinilo y la metionina 245. Si la adición del azufre de la metionina al grupo vinilo da lugar a un aducto saturado, sin regeneración del doble enlace, la unión resultante podría ser porfirina-CH₂-CH₂-S⁺(Me)Cys, porfirina-CHX-CH₂-S⁺(Me)Cys o porfirina-CH(OH)-CH₂-S⁺(Me)Cys.

La hipótesis de que los grupos vinilo del hemo son elementos claves en la formación de los enlaces covalentes entre el hemo y el LBD de E75 de *O. fasciatus*, se ve reforzada por el hecho de que la expresión del LBD de E75 de *O. fasciatus* en la cepa de *E. coli* RP523 en presencia de mesohemo, un análogo de porfirina cuyos grupos vinilo han sido sustituidos por etilos, conlleva la ausencia completa de unión covalente de mesohemo a la proteína purificada.

El análisis de las secuencias de los LBD de las isoformas de *O. fasciatus* y *B. germanica* revela que sólo unos pocos residuos presentes en su secuencia son responsables de sus propiedades espectroscópicas excepcionales y de la unión covalente del hemo a la proteína. Los resultados obtenidos con las hemoproteínas quimera de *Drosophila-Oncopeltus* indican que uno de los aminoácidos implicados en la unión covalente del hemo ha de estar presente en la región N-terminal y otro en la región C-terminal de la hélice α 5, pues es en esa hélice α donde se encuentra el nexo de unión de ambas quimeras y ambas conservan parte del hemo unido covalentemente, si bien en menor medida que el LBD de E75 de *O. fasciatus* silvestre (Tabla 3).

Los resultados mostrados refuerzan la idea de que es bastante improbable que los LBDs de E75 de insectos funcionen como sensores de hemo *in vivo*, dado que el hemo covalentemente unido no puede ser liberado del bolsillo hidrofóbico de la proteína. En esta misma línea, debe resaltarse que la fuerte unión del hemo al LBD de E75 de *D. melanogaster* descrita anteriormente y la imposibilidad de purificar la proteína sin hemo unido, indican que la unión y liberación del hemo no es probable que ocurra en estas especies.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los LBDs de E75 de insectos desempeñan un papel como sensores de gases diatómicos. A pesar de ser purificados aeróbicamente como hemoproteínas en estado férrico, para poder ser regulados mediante la unión de •NO y CO *in vivo*, los LBDs de E75 de estos insectos deberían estar presentes en su forma reducida en el núcleo celular. Los espectros de absorción UV/visible obtenidos para los tres LBDs de E75 de *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori* en su estado ferroso son muy similares entre sí (Figura 10), con el pico del Soret presentando un máximo a 425 nm y con bandas α/β bien definidas a 559 and 530 nm, indicativo de la sustitución o pérdida del ligando cisteína (tiolato) que se coordinaba con el hemo en su estado férrico, resultados que están en concordancia con los publicados anteriormente para *D. melanogaster* (Marvin et al., 2009). Las posiciones de los picos del espectro de absorción UV/visible en el estado reducido son comparables a los de hemoproteínas con el hierro en bajo espín, hexacoordinadas en las que dos ligandos axiales neutros se coordinan con el Fe(II), como ocurre en la neuroglobina (Dewilde et al., 2001) y en el citocromo *b₅* (Boispoli.R y Ehrenber.A, 1967; Durley y Mathews, 1996). Si el ligando cisteína se retuviera, la banda del Soret sufriría un desplazamiento hacia el rojo hasta los 450 nm como ocurre en los citocromo P450 y en las cloroperoxidasas (Dawson y Sono, 1987). Un reemplazamiento de ligando similar ocurre en *RrCooA*, en la que tras la reducción del hierro, el ligando Cys es reemplazado por His, dando lugar a Fe(II)*RrCooA* hexacoordinado (His/Pro) en bajo espín, con el Soret centrado a 425 nm (Roberts et al., 2005). La titulación en condiciones anaeróbicas (Figura 10) reveló que la forma reducida del LBD de E75 de *O. fasciatus* forma los complejos tanto con •NO como con CO, lo que implica que probablemente *in vivo* los gases diatómicos regulen también su actividad represora transcripcional. En concordancia con los modelos propuestos (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005), este cambio conformacional inducido por la unión de •NO o CO debería conllevar la liberación de su heterodímero HR3, que podría desempeñar así su papel como activador transcripcional.

Sin embargo, los espectros publicados de los complejos con •NO de los LBDs de E75 y de Rev-erb β son considerablemente diferentes (Marvin et al., 2009). Mientras que los espectros correspondientes al complejo con •NO de las isoformas de *D. melanogaster* y *B. mori*, presentan un máximo a 385 nm, característico de hemoproteínas cuyo hierro está en estado ferroso pentacoordinado sólo con •NO, los espectros obtenidos para los LBDs de Rev-erb β (con un máximo de absorción a 418 nm) y de E75 de *O. fasciatus* (con un máximo de absorción a 416 nm), corresponden muy probablemente a hemos

hexacoordinados con la cadena lateral de una His en posición *trans* al •NO (de Rosny et al., 2006; Marvin et al., 2009; Reinking et al., 2005). De forma similar, se han descrito complejos hexacoordinados Fe(II)NO en hemoproteínas como mioglobina (Soret a 421 nm (Decatur et al., 1996)), peroxidasa del rábano (Soret a 419 nm (Ischiropoulos et al., 1996)), neuroglobina (Soret a 416 nm (Herold et al., 2004)) o ChCooA (Soret a 418 nm (Clark et al., 2006)).

Aunque hasta la fecha se desconoce qué beneficio puede proporcionar el hecho de que el hemo se una covalentemente al menos en estas dos isoformas, ya que el hemo es completamente funcional en los LBDs de E75 de *D. melanogaster* y *B. mori*, es muy probable que la unión covalente del hemo proporcione alguna ventaja o diferencia funcional o estructural.

Si bien no se comprende completamente por qué el grupo hemo se une covalentemente a algunas proteínas o incluso sólo a algunos miembros de una familia de proteínas, hay datos que aclaran esta cuestión. Por ejemplo, solamente algunos miembros de la familia CYP4 de citocromos P450 unen su grupo hemo de forma covalente y este enlace covalente del hemo satisface algún requerimiento que es específico para algunas de ellas. Un papel que se ha asignado a la formación del enlace covalente en ellas es favorecer la ω -regioespecificidad frente a la $(\omega - 1)$ -regioespecificidad, aumentando el ratio de hidroxilación $\omega/(\omega - 1)$ de la cadena de ácido graso. Así por ejemplo mientras que CYP4A1 oxida el ácido láurico con una relación de regioespecificidad de 20:1 $\omega/(\omega - 1)$, esta relación en el mutante Glu320Ala que no une el hemo covalentemente cae a 5:1 (Colas y Ortiz de Montellano, 2003).

En el caso de las peroxidasas de mamíferos aparentemente no existe relación entre la presencia de los enlaces covalentes de tipo éster y la especificidad de sustrato de estas enzimas. Todas las peroxidasas, incluidas las de plantas y hongos que carecen de enlaces covalentes con su grupo hemo, oxidan fenoles, ion yoduro y tiocianato (Colas y Ortiz de Montellano, 2003). La oxidación más difícil del bromuro es catalizada de forma más eficiente por las peroxidasas de mamíferos (Jakopitsch et al., 2001; Munir y Dordick, 2000). Sin embargo, sí que existe una relación clara entre la presencia del enlace vinil-sulfonio en la mieloperoxidasa y su capacidad excepcional para oxidar cloruro. El efecto electroceptor del enlace vinil-metionil sulfonio cargado positivamente, puede aumentar el potencial redox de las especies ferrilo, o como se ha postulado posteriormente (Blair-Johnson et al., 2001), disminuir la densidad electrónica en el enlace δ -metino de manera que aumenta la transferencia de electrones hacia esa posición desde un ion cloruro vecino.

El hecho de que el hemo covalentemente unido al LBD de E75 de *O. fasciatus* responda a la presencia de CO y •NO indica que los gases diatómicos también están implicados en la señalización a través de este receptor nuclear, si bien sus biomoléculas efectoras subsiguientes podrían ser diferentes.

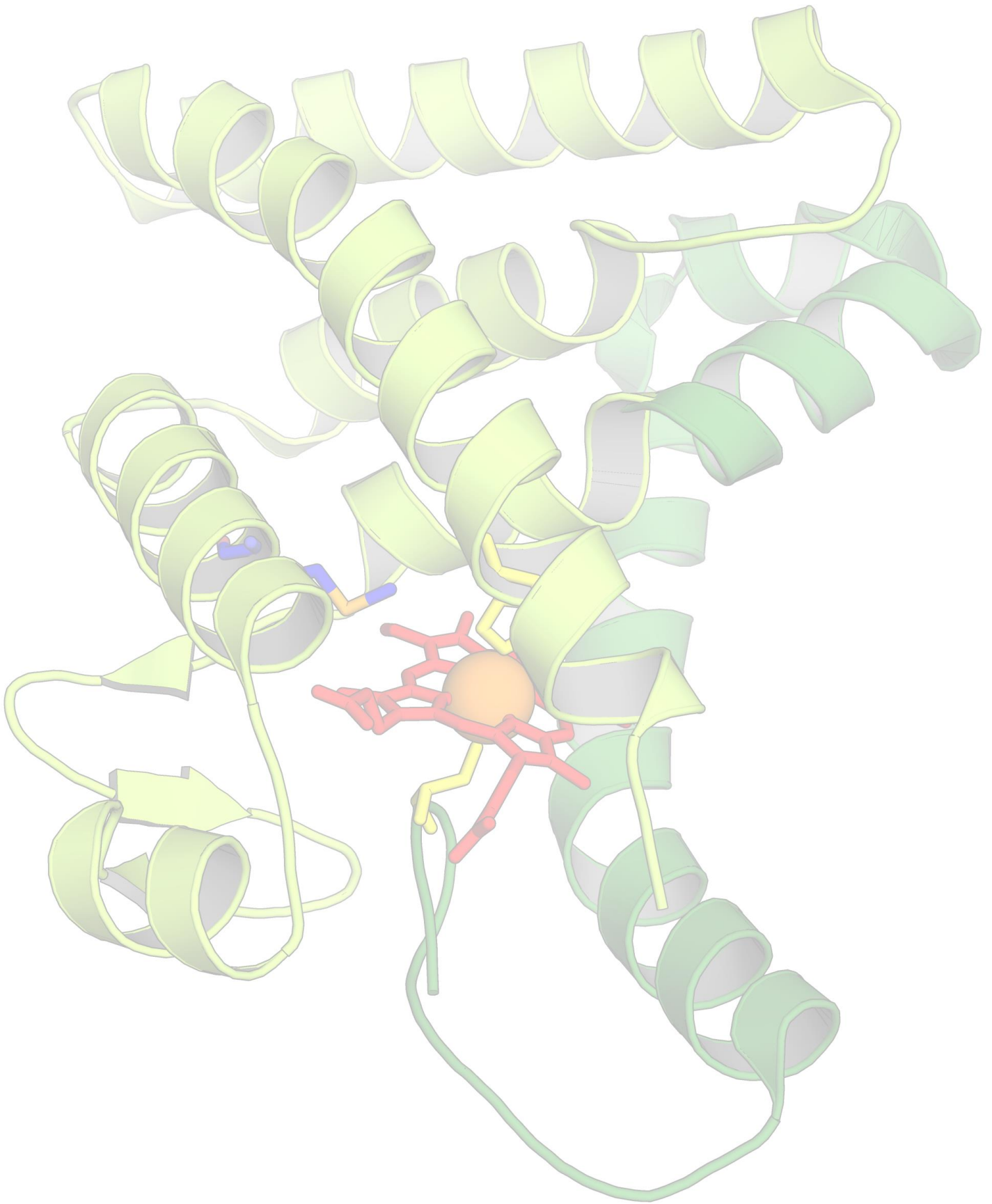
Es interesante resaltar que recientemente se han descubierto diferencias importantes en cuanto al patrón de expresión temporal y la especificación de parasegmentos del gen de E75 entre *D. melanogaster* y *O. fasciatus*. Uno de los primeros pasos en la segmentación del embrión de *Drosophila* (y

en otros artrópodos) no es la formación de segmentos, sino la formación de unos dominios que se conocen como parasegmentos, cada uno de los cuales invade segmentos adyacentes (Martinezarias y Lawrence, 1985). Un parasegmento y no un segmento, constituye la unidad fundamental del desarrollo de *Drosophila* y está constituido por porciones de dos segmentos adyacentes a lo largo del cuerpo del embrión y vienen definidos por fronteras compartimentales funcionales.

Además, la subdivisión del eje anteroposterior del cuerpo en *Drosophila* depende de la acción sucesiva de los genes de segmentación: *maternal*, *gap*, *pair-rule*, *segment polarity* y *homeotic* (HOX) (Ingham, 1988; Stjohnston y Nussleinvohard, 1992). En relación a las diferencias importantes en cuanto al patrón de expresión temporal y la especificación de parasegmentos del gen de E75 entre *D. melanogaster* y *O. fasciatus* que se ha comentado anteriormente, primero hay que destacar que, a diferencia del gen E75A en *D. melanogaster*, el gen E75A en *O. fasciatus* es un gen *pair-rule* necesario para la especificación de los parasegmentos impares (Erezyilmaz et al., 2009). Por otro lado, mientras que en *D. melanogaster* el mRNA de E75A se hereda de la madre, se distribuye uniformemente y se transcribe por primera vez entre las 6 y 8 h tras la deposición de huevos (Dubrovsky et al., 2004), los genes *pair-rule*, como es el caso de E75A de *O. fasciatus* se expresan entre 1.5 y 3 h contando desde el comienzo de la celularización hasta la gastrulación (Erezyilmaz et al., 2009). Claramente, la ruta de señalización es diferente entre *D. melanogaster* y sus ortólogos de *O. fasciatus* y *B. germanica* ya que en *D. melanogaster* la expresión de E75A en el desarrollo postembrionario se inicia por ecdisteroides y la aparición de distintas isoformas también depende de cambios en los niveles de ecdisteroides (Dubrovsky et al., 2004; Segraves y Hogness, 1990). Sin embargo, se desconoce si los ecdisteroides son responsables de la iniciación de la expresión de E75 en los embriones de *O. fasciatus* y *B. germanica*. Además, el mRNA de E75A se puede encontrar en el embrión temprano de *B. germanica*, pero no se correlaciona con un aumento en los niveles de ecdisteroide (Mane-Padros et al., 2008).

Nuestros resultados indican que si bien los LBDs de E75 de los cuatro insectos caracterizados se purifican como hemoproteínas, la unión covalente del hemo podría conllevar diferentes funciones *in vivo*.

Existe así la posibilidad de que diferentes especies de insectos regulen la señalización a través los receptores nucleares E75 por vías divergentes.



CONCLUSIONES

- Los LBD de E75 de *B. mori* y de *D. melanogaster* se purifican como hemoproteínas en estado férrico y de la comparación de sus características espectroscópicas analizadas mediante espectroscopía de absorción UV/visible, dicroísmo circular y EPR con las de otras hemoproteínas, se puede concluir que el hierro está en configuración de bajo espín y su grupo hemo está hexacoordinado con una cisteína y un ligando neutro, como es la histidina. El hecho de que en los espectros de EPR se observen varias componentes refleja que existe heterogeneidad en la coordinación del hierro, si bien todos los valores g están en el intervalo encontrado para hemoproteínas que tienen por ligando axial una cisteína.

- Sin embargo, los LBD de E75 de *O. fasciatus* y de *B. germanica* se purifican como hemoproteínas en estado férrico con el hierro del hemo en configuración de alto espín, cuyo hemo está hexacoordinado con una histidina y probablemente una molécula de agua. Los datos de EPR obtenidos para el LBD de E75 de *O. fasciatus* confirman que esta hemoproteína se purifica con una mezcla de componentes de alto y bajo espín.

- Los espectros de absorción UV/visible obtenidos para los tres LBDs de E75 de *D. melanogaster*, *O. fasciatus* y *B. mori* en su estado ferroso son muy similares entre sí. Las posiciones de los picos del espectro de absorción UV/visible en el estado reducido son indicativos de la sustitución o pérdida del ligando cisteína que se coordinaba con el hemo en su estado férrico, y son comparables a los de hemoproteínas con el hierro en bajo espín, hexacoordinadas con dos ligandos axiales neutros.

- La titulación en condiciones anaeróbicas reveló que la forma reducida del LBD de E75 de *O. fasciatus* forma los complejos tanto con $\bullet\text{NO}$ como con CO, lo que implica que probablemente *in vivo* los gases diatómicos regulen también su actividad represora transcripcional. Sin embargo, mientras que los espectros correspondientes al complejo con $\bullet\text{NO}$ de las isoformas de *D. melanogaster* y *B. mori*, presentan un máximo a 385 nm, característico de hemoproteínas cuyo hierro está en estado ferroso pentacoordinado sólo con $\bullet\text{NO}$, el espectro obtenido para el LBD E75 de *O. fasciatus* (con un máximo de absorción a 416 nm), corresponde muy probablemente a un hemo hexacoordinado con la cadena lateral de una His en posición *trans* al $\bullet\text{NO}$.

- Del análisis mediante HPLC de los perfiles de elución de los LBDs de E75 de los cuatro insectos en una columna de fase reversa en condiciones ácidas, se demostró que en las isoformas de *O. fasciatus* y *B. germanica* el grupo hemo no sólo está coordinado, sino que está unido covalentemente. Los resultados obtenidos con las hemoproteínas quimera de *Drosophila-Oncopeltus* indican el hemo está unido a la cadena lateral de al menos dos aminoácidos, uno de los cuales ha de estar presente en la región N-terminal y el otro en la región C-terminal respecto de la hélice α 5, ya que ambas proteínas quimera

conservan parte del hemo unido covalentemente, si bien en menor medida que el LBD de E75 de *O. fasciatus* silvestre.

- Los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas indican que la Met245 de *O. fasciatus* podría ser uno de los aminoácidos responsables de la unión covalente del grupo hemo. La ausencia de cambios espectroscópicos importantes en el mutante puntual Met245Thr, probablemente refleje la reducción del grupo vinilo del hemo y la formación de un enlace etilo entre la proteína, a través de la Met245 y el hemo.

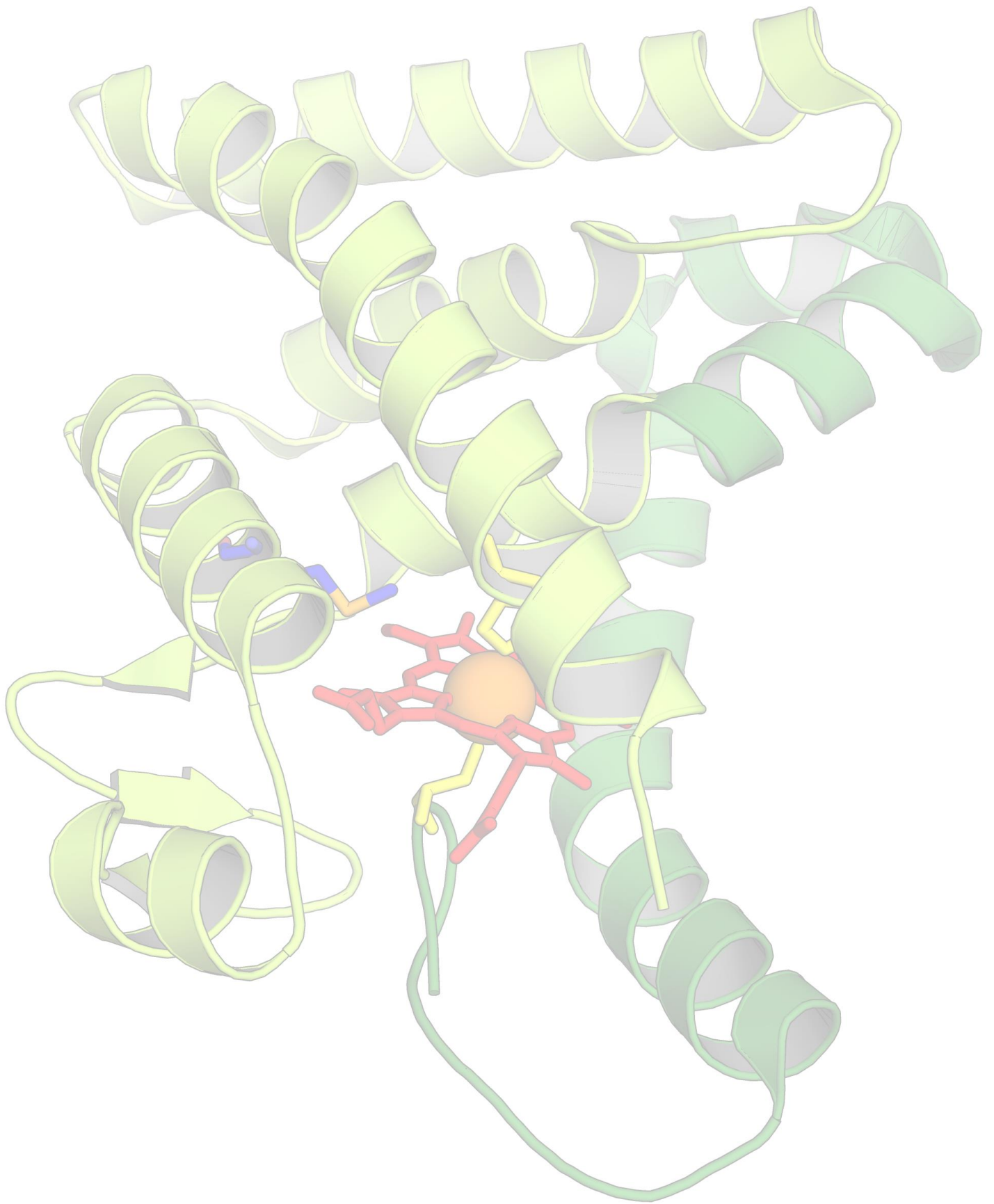
- La expresión del LBD de E75 de *O. fasciatus* en la cepa de *E. coli* RP523 deficiente en hemo en presencia de mesohemo, un análogo de porfirina cuyos grupos vinilo han sido sustituidos por etilos, y la consiguiente ausencia de unión covalente del mismo, refuerza la hipótesis de que los grupos vinilo del hemo son elementos claves en la formación de los enlaces covalentes entre el hemo y el LBD de E75 de *O. fasciatus*.

- Los resultados mostrados refuerzan la idea de que es bastante improbable que los LBDs de E75 de insectos funcionen como sensores de hemo *in vivo*, dado que el hemo covalentemente unido no puede ser liberado del bolsillo hidrofóbico de la proteína, y apoyan la hipótesis de que los LBDs de E75 de insectos desempeñan un papel como sensores de gases diatómicos. En esta misma línea, debe resaltarse que la fuerte unión del hemo al LBD de E75 de *D. melanogaster* descrita anteriormente y la imposibilidad de purificar la proteína sin hemo unido, indican que la unión y liberación del hemo no es probable que ocurra en estas especies.

- El hecho de que el hemo covalentemente unido al LBD de E75 de *O. fasciatus* responda a la presencia de CO y •NO indica que los gases diatómicos también están implicados en la señalización a través de este receptor nuclear, si bien sus biomoléculas efectoras subsiguientes podrían ser diferentes.

- Nuestros resultados indican que si bien los LBDs de E75 de los cuatro insectos caracterizados se purifican como hemoproteínas, la unión covalente del hemo podría conllevar diferentes funciones *in vivo*. Existe así la posibilidad de que diferentes especies de insectos regulen la señalización a través los receptores nucleares E75 por vías divergentes.

- Finalmente, estos descubrimientos amplían las clases de hemoproteínas en las que el grupo hemo está unido de forma natural a la cadena polipeptídica.



REFERENCIAS

- Ampleford, E.J. (1985). Ecdysteroids Influence the Circadian System Timing Ecdysis in the Insect *Rhodnius-Prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 157, 699-704.
- Andrews, S.C., Arosio, P., Bottke, W., Briat, J.F., Vondarl, M., Harrison, P.M., Lahlhere, J.P., Levi, S., Lobreaux, S., and Yewdall, S.J. (1992). Structure, Function, and Evolution of Ferritins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 47, 161-174.
- Auclair, K., and Ortiz de Montellano, P.R. (2000). Heme oxygenase structure and mechanism. In *Phorphyrin Handbook*, K. Kadish, K. Smith, and R. Guilard, eds. (New York, Academic Press), pp. 183-210.
- Barker, P.D., and Ferguson, S.J. (1999). Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure with Folding & Design* 7, R281-R290.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1987). Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* 161, 1-15.
- Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W.A., and Thummel, C.S. (2002). Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 209-220.
- Blair-Johnson, M., Fiedler, T., and Fenna, R. (2001). Human myeloperoxidase: Structure of a cyanide complex and its interaction with bromide and thiocyanate substrates at 1.9 angstrom resolution. *Biochemistry* 40, 13990-13997.
- Boisspolt, R., and Ehrenber, A. (1967). Magnetic and Spectrophotometric Investigations of Cytochrome B5. *European Journal of Biochemistry* 2, 361-&.
- Bownes, M., Shirras, A., Blair, M., Collins, J., and Coulson, A. (1988). Evidence That Insect Embryogenesis Is Regulated by Ecdysteroids Released from Yolk Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1554-1557.
- Breslow, E., and Koehler, R. (1965). Combination of Protoporphyrin 9 with Sperm Whale Apomyoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 240, 2266-&.
- Breslow, E., Koehler, R., and Girotti, A.W. (1967). Properties of Protoporphyrin-Apomyoglobin Complexes and Related Compounds. *Journal of Biological Chemistry* 242, 4149-&.
- Broadus, J., McCabe, J.R., Endrizzi, B., Thummel, C.S., and Woodard, C.T. (1999). The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Molecular Cell* 3, 143-149.
- Brown, K.R., Allan, B.A., Do, P., and Hegg, E.L. (2002). Identification of novel hemes generated by heme A synthase: Evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* 41, 10906-10913.
- Burris, T.P. (2008). Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol* 22, 1509-1520.
- Bushnell, G.W., Louie, G.V., and Brayer, G.D. (1990). High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J Mol Biol* 214, 585-595.
- Buszczak, M., Freeman, M.R., Carlson, J.R., Bender, M., Cooley, L., and Segraves, W.A. (1999). Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 126, 4581-4589.
- Caceres, L., Necakov, A.S., Schwartz, C., Kimber, S., Roberts, I.J., and Krause, H.M. (2011). Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. *Genes Dev* 25, 1476-1485.
- Cao, X.H., Liu, W., Lin, F., Li, H., Kolluri, S.K., Lin, B.Z., Han, Y.H., Dawson, M.I., and Zhang, X.K. (2004). Retinoid X receptor regulates Nur77/thyroid hormone receptor 3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9705-9725.
- Clark, R.W., Lanz, N.D., Lee, A.J., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Burstyn, J.N. (2006). Unexpected NO-dependent DNA binding by the CooA homolog from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 891-896.
- Colas, C., Kuo, J.M., and Ortiz de Montellano, P.R. (2002). Asp-225 and glu-375 in autocatalytic attachment of the prosthetic heme group of lactoperoxidase. *J Biol Chem* 277, 7191-7200.
- Colas, C., and Ortiz de Montellano, P.R. (2003). Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification. *Chem Rev* 103, 2305-2332.
- Crane, B.R., Siegel, L.M., and Getzoff, E.D. (1995). Sulfite Reductase Structure at 1.6 Angstrom - Evolution and Catalysis for Reduction of Inorganic Anions. *Science* 270, 59-67.
- Chan, S.M. (1998). Cloning of a shrimp (*Metapanaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: an insect homologue of E75 gene. *FEBS Lett* 436, 395-400.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870.
- Dawson, J.H., and Sono, M. (1987). Cytochrome P-450 and Chloroperoxidase - Thiolate-Ligated Heme Enzymes - Spectroscopic Determination of Their Active-Site Structures and Mechanistic Implications of Thiolate Ligation. *Chemical Reviews* 87, 1255-1276.
- de Rosny, E., de Groot, A., Jullian-Binard, C., Gaillard, J., Borel, F., Pebay-Peyroula, E., Fontecilla-Camps, J.C., and Jouve, H.M. (2006). *Drosophila* nuclear receptor E75 is a thiolate hemoprotein. *Biochemistry* 45, 9727-9734.
- Decatur, S.M., Franzen, S., DePillis, G.D., Dyer, R.B., Woodruff, W.H., and Boxer, S.G. (1996). Trans effects in nitric oxide binding to myoglobin cavity mutant H93G. *Biochemistry* 35, 4939-4944.
- DePillis, G.D., Ozaki, S., Kuo, J.M., Maltby, D.A., and Ortiz de Montellano, P.R. (1997). Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group. *J Biol Chem* 272, 8857-8860.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts, T., Marden, M.C., Caubergs, R., and Moens, L. (2001). Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem* 276, 38949-38955.

- Dickerson, R., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A., and Margolia, E. (1971). Ferricytochrome C. I. General Features of Horse and Bionite Proteins at 2.8 Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry* 246, 1511-8.
- Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V.A., and Berger, E.M. (2004). Hormonal regulation and functional role of Drosophila E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev Biol* 268, 258-270.
- Duez, H., and Staels, B. (2008). Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett* 582, 19-25.
- Durley, R.C.E., and Mathews, F.S. (1996). Refinement and structural analysis of bovine cytochrome b(5) at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 52, 65-76.
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R., and Kroneck, P.M.H. (1999). Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* 400, 476-480.
- Erezyilmaz, D.F., Kelstrup, H.C., and Riddiford, L.M. (2009). The nuclear receptor E75A has a novel pair-rule-like function in patterning the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Dev Biol* 334, 300-310.
- Escriva, H., Bertrand, S., and Laudet, V. (2004). The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40, 11-26.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Eystathiou, T., Swevers, L., and Iatrou, K. (2001). The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech Dev* 103, 107-115.
- Fahrbach, S.E., Smaghe, G., and Velarde, R.A. (2012). Insect nuclear receptors. *Annu Rev Entomol* 57, 83-106.
- Ferguson-Miller, S., and Babcock, G.T. (1996). Heme/copper terminal oxidases. *Chemical Reviews* 96, 2889-2907.
- Fiedler, T.J., Davey, C.A., and Fenna, R.E. (2000). X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* 275, 11964-11971.
- Fischer, H., and Zeile, K. (1929). Synthesis of the hematoporphyrin protoporphyrin and hamin. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* 468, 98-116.
- Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocrine Reviews* 20, 689-725.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development* 14, 121-141.
- Gonzalez, G., Dioum, E.M., Bertolucci, C.M., Tomita, T., Ikeda-Saito, M., Cheesman, M.R., Watmough, N.J., and Gilles-Gonzalez, M.A. (2002). Nature of the displaceable heme-axial residue in the EcDox protein, a heme-based sensor from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 41, 8414-8421.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38, W695-699.
- Gupta, N., and Ragsdale, S.W. (2011). Thiol-disulfide redox dependence of heme binding and heme ligand switching in nuclear hormone receptor rev-erb{beta}. *J Biol Chem* 286, 4392-4403.
- Hager, G.L., Lim, C.S., Elbi, C., and Baumann, C.T. (2000). Trafficking of nuclear receptors in living cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 249-254.
- Hannas, B.R., and LeBlanc, G.A. (2010). Expression and ecdysteroid responsiveness of the nuclear receptors HR3 and E75 in the crustacean *Daphnia magna*. *Mol Cell Endocrinol* 315, 208-218.
- Hannas, B.R., Wang, Y.H., Baldwin, W.S., Li, Y.C., Wallace, A.D., and LeBlanc, G.A. (2010). Interactions of the crustacean nuclear receptors HR3 and E75 in the regulation of gene transcription. *General and Comparative Endocrinology* 167, 268-278.
- Harding, H.P., and Lazar, M.A. (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* 15, 4791-4802.
- Hargrove, M.S., Barrick, D., and Olson, J.S. (1996a). The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry* 35, 11293-11299.
- Hargrove, M.S., and Olson, J.S. (1996). The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. *Biochemistry* 35, 11310-11318.
- Hargrove, M.S., Wilkinson, A.J., and Olson, J.S. (1996b). Structural factors governing heme dissociation from metmyoglobin. *Biochemistry* 35, 11300-11309.
- Hayashi, T., Hitomi, Y., Suzuki, A., Takimura, T., and Ogoshi, H. (1995). Molecular Recognition of Horse Heart Apomyoglobin to Monopropionate Heme - Thermodynamic Determination of 2 Orientational Isomers by H-1-Nmr Spectra. *Chemistry Letters*, 911-912.
- Henne, K.R., Kunze, K.L., Zheng, Y.M., Christmas, P., Soberman, R.J., and Rettie, A.E. (2001). Covalent linkage of prosthetic heme to CYP4 family P450 enzymes. *Biochemistry* 40, 12925-12931.
- Herold, S., Fago, A., Weber, R.E., Dewilde, S., and Moens, L. (2004). Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 22841-22847.
- Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2004). Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3. *Dev Biol* 272, 510-521.
- Hoch, U., and de Montellano, P.R.O. (2001). Covalently linked heme in cytochrome P450A fatty acid hydroxylases. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11339-11346.
- Ingham, P.W. (1988). The Molecular-Genetics of Embryonic Pattern-Formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.
- Ischiropoulos, H., Nelson, J., Duran, D., and Al-Mehdi, A. (1996). Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 20, 373-381.

- Jakopitsch, C., Regelsberger, G., Furtmüller, P.G., Ruker, F., Peschek, G.A., and Obinger, C. (2001). Catalase-peroxidase from *Synechocystis* is capable of chlorination and bromination reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 682-687.
- Jindra, M., Sehna, F., and Riddiford, L.M. (1994). Isolation, characterization and developmental expression of the ecdysteroid-induced E75 gene of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Biochem* 221, 665-675.
- Johnston, D.M., Sedkov, Y., Petruk, S., Riley, K.M., Fujioka, M., Jaynes, J.B., and Mazo, A. (2011). Ecdysone- and NO-mediated gene regulation by competing EcR/Usf and E75A nuclear receptors during *Drosophila* development. *Mol Cell* 44, 51-61.
- Karmirantzou, M., and Thornton, J.M. (1998). Computational approaches to protein ligand interactions: Protein-heme complexes (Copenhagen, Munksgaard).
- King-Jones, K., and Thummel, C.S. (2005). Nuclear receptors--a perspective from *Drosophila*. *Nat Rev Genet* 6, 311-323.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P., and Hogness, D.S. (1991). The *Drosophila* EcR Gene Encodes an Ecdysone Receptor, a New Member of the Steroid-Receptor Superfamily. *Cell* 67, 59-77.
- Kooter, I.M., Moguilevsky, N., Bollen, A., van der Veen, L.A., Otto, C., Dekker, H.L., and Wever, R. (1999). The sulfonium ion linkage in myeloperoxidase. Direct spectroscopic detection by isotopic labeling and effect of mutation. *J Biol Chem* 274, 26794-26802.
- Kotsonis, P., Fröhlich, L.G., Raman, C.S., Li, H.Y., Berg, M., Gerwig, R., Groehn, V., Kang, Y.H., Al-Masoudi, N., Taghavi-Moghadam, S., *et al.* (2001). Structural basis for pterin antagonism in nitric-oxide synthase - Development of novel 4-oxo-pteridine antagonists of (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry* 276, 49133-49141.
- Lam, G.T., Jiang, C., and Thummel, C.S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.
- Lan, Q., Wu, Z., and Riddiford, L.M. (1997). Regulation of the ecdysone receptor, USP, E75 and MHR3 mRNAs by 20-hydroxyecdysone in the GV1 cell line of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Mol Biol* 6, 3-10.
- Lanzilotta, W.N., Schuller, D.J., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Poulos, T.L. (2000). Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nature Structural Biology* 7, 876-880.
- Laufer, H., Ahl, J., Rotllant, G., and Baclaski, B. (2002). Evidence that ecdysteroids and methyl farnesoate control allometric growth and differentiation in a crustacean. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 205-210.
- Lavorgna, G., Karim, F.D., Thummel, C.S., and Wu, C. (1993). Potential Role for a Ftz-F1 Steroid-Receptor Superfamily Member in the Control of *Drosophila* Metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3004-3008.
- LeBrun, L.A., Hoch, U., and Ortiz de Montellano, P.R. (2002a). Autocatalytic mechanism and consequences of covalent heme attachment in the cytochrome P450A4 family. *J Biol Chem* 277, 12755-12761.
- LeBrun, L.A., Xu, F., Kroetz, D.L., and Ortiz de Montellano, P.R. (2002b). Covalent attachment of the heme prosthetic group in the CYP4F cytochrome P450 family. *Biochemistry* 41, 5931-5937.
- Leys, D., Backers, K., Meyer, T.E., Hagen, W.R., Cusanovich, M.A., and Van Beeumen, J.J. (2000). Crystal structures of an oxygen-binding cytochrome c from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16050-16056.
- Liu, D.H., Williamson, D.A., Kennedy, M.L., Williams, T.D., Morton, M.M., and Benson, D.R. (1999). Aromatic side chain-porphyrin interactions in designed hemoproteins. *Journal of the American Chemical Society* 121, 11798-11812.
- Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2007). Nuclear receptor coregulators: Judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Molecular Cell* 27, 691-700.
- Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Belles, X., and Martin, D. (2008). The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Dev Biol* 315, 147-160.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., *et al.* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Markov, G.V., and Laudet, V. (2011). Origin and evolution of the ligand-binding ability of nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* 334, 21-30.
- Martinez, S.E., Huang, D., Ponomarev, M., Cramer, W.A., and Smith, J.L. (1996). The heme redox center of chloroplast cytochrome f is linked to a buried five-water chain. *Protein Science* 5, 1081-1092.
- Martinezarias, A., and Lawrence, P.A. (1985). Parasegments and Compartments in the *Drosophila* Embryo. *Nature* 313, 639-642.
- Marvin, K.A., Reinking, J.L., Lee, A.J., Pardee, K., Krause, H.M., and Burstyn, J.N. (2009). Nuclear receptors homo sapiens Rev-erb β and *Drosophila* melanogaster E75 are thiolate-ligated heme proteins which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO. *Biochemistry* 48, 7056-7071.
- Metcalfe, C.L., Ott, M., Patel, N., Singh, K., Mistry, S.C., Goff, H.M., and Raven, E.L. (2004). Autocatalytic formation of green heme: evidence for H₂O₂-dependent formation of a covalent methionine-heme linkage in ascorbate peroxidase. *J Am Chem Soc* 126, 16242-16248.
- Mogi, T., Saiki, K., and Anraku, Y. (1994). Biosynthesis and Functional-Role of Heme-O and Heme-A. *Molecular Microbiology* 14, 391-398.
- Moore, G.R., and Pettigrew, G.W. (1990). *Cytochromes c: Evolutionary, Structural, and Physicochemical Aspects* (New York, Springer).
- Munir, I.Z., and Dordick, J.S. (2000). Soybean peroxidase as an effective bromination catalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 337-341.

- Myer, Y.P., and Pande, A. (1978). Circular dichroism studies of hemoproteins and heme models. In *The Porphyrins*, D. Dolphin, ed. (Academic Press), pp. 271-322.
- Neri, F., Indiani, C., Baldi, B., Vind, J., Welinder, K.G., and Smulevich, G. (1999). Role of the distal phenylalanine 54 on the structure, stability, and ligand binding of Coprinus cinereus peroxidase. *Biochemistry* 38, 7819-7827.
- O'Brian, M.R., and Thony-Meyer, L. (2002). Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes. *Advances in Microbial Physiology*, Vol 46 46, 257-318.
- Ortiz de Montellano, P.R., and Wilks, A. (2000). Heme oxygenase structure and mechanism. *Advances in Inorganic Chemistry* 51, 359-407.
- Oxvig, C., Thomsen, A.R., Overgaard, M.T., Sorensen, E.S., Hojrup, P., Bjerrum, M.J., Gleich, G.J., and Sottrup-Jensen, L. (1999). Biochemical evidence for heme linkage through esters with Asp-93 and Glu-241 in human eosinophil peroxidase - The ester with Asp-93 is only partially formed in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16953-16958.
- Palmer, G. (1979). In *The Porphyrins*, D. Dolphin, ed. (New York, Academic Press), pp. 313-350.
- Palli, S.R., Ladd, T.R., Ricci, A.R., Sohi, S.S., and Retnakaran, A. (1997). Cloning and development expression of Choristoneura hormone receptor 75: a homologue of the Drosophila E75A gene. *Dev Genet* 20, 36-46.
- Palli, S.R., Sohi, S.S., Cook, B.J., Lambert, D., Ladd, T.R., and Retnakaran, A. (1995). Analysis of ecdysteroid action in Malacosoma disstria cells: cloning selected regions of E75- and MHR3-like genes. *Insect Biochem Mol Biol* 25, 697-707.
- Pardee, K.I., Xu, X., Reinking, J., Schuetz, A., Dong, A., Liu, S., Zhang, R., Tiefenbach, J., Lajoie, G., Plotnikov, A.N., *et al.* (2009). The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERBbeta. *PLoS Biol* 7, e43.
- Pazicni, S. (2006). Towards understanding the role of the heme cofactor in cystathionine β -synthase (Madison, WI, University of Wisconsin).
- Phelan, C.A., Gampe, R.T., Jr., Lambert, M.H., Parks, D.J., Montana, V., Bynum, J., Broderick, T.M., Hu, X., Williams, S.P., Nolte, R.T., *et al.* (2010). Structure of Rev-erbalpha bound to N-CoR reveals a unique mechanism of nuclear receptor-co-repressor interaction. *Nat Struct Mol Biol* 17, 808-814.
- Pipirou, Z., Bottrill, A.R., Metcalfe, C.M., Mistry, S.C., Badyal, S.K., Rawlings, B.J., and Raven, E.L. (2007). Autocatalytic formation of a covalent link between tryptophan 41 and the heme in ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 46, 2174-2180.
- Pipirou, Z., Guallar, V., Basran, J., Metcalfe, C.L., Murphy, E.J., Bottrill, A.R., Mistry, S.C., and Raven, E.L. (2009). Peroxide-dependent formation of a covalent link between Trp51 and the heme in cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 48, 3593-3599.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., and Howard, A.J. (1987). High-Resolution Crystal-Structure of Cytochrome-P450cam. *Journal of Molecular Biology* 195, 687-700.
- Rae, T.D., and Goff, H.M. (1998). The heme prosthetic group of lactoperoxidase - Structural characteristics of heme 1 and heme 1-peptides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 27968-27977.
- Raghuram, S., Stayrook, K.R., Huang, P., Rogers, P.M., Nosie, A.K., McClure, D.B., Burris, L.L., Khorasanizadeh, S., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1207-1213.
- Ramakrishnan, S.N., and Muscat, G.E. (2006). The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation? *Nucl Recept Signal* 4, e009.
- Reinking, J., Lam, M.M., Pardee, K., Sampson, H.M., Liu, S., Yang, P., Williams, S., White, W., Lajoie, G., Edwards, A., *et al.* (2005). The Drosophila nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell* 122, 195-207.
- Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J., and Muscat, G.E. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol Endocrinol* 14, 700-717.
- Renaud, J.P., and Moras, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* 57, 1748-1769.
- Reynolds, M.F., Parks, R.B., Burstyn, J.N., Shelper, D., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Roberts, G.P., Vogel, K.M., and Spiro, T.G. (2000). Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CoxA, a CO-sensing transcription activator from R. rubrum, reveals a five-coordinate NO-heme. *Biochemistry* 39, 388-396.
- Richard, D.S., Watkins, N.L., Serafin, R.B., and Gilbert, L.I. (1998). Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by Drosophila melanogaster oocytes. *Journal of Insect Physiology* 44, 637-644.
- Roberts, G.P., Kerby, R.L., Youn, H., and Conrad, M. (2005). CoxA, a paradigm for gas sensing regulatory proteins. *J Inorg Biochem* 99, 280-292.
- Rodriguez-Crespo, I., Nishida, C.R., Knudsen, G.M., and de Montellano, P.R. (1999). Mutation of the five conserved histidines in the endothelial nitric-oxide synthase hemoprotein domain. No evidence for a non-heme metal requirement for catalysis. *J Biol Chem* 274, 21617-21624.
- Rodriguez-Crespo, I., and Ortiz de Montellano, P.R. (1996). Human endothelial nitric oxide synthase: expression in Escherichia coli, coexpression with calmodulin, and characterization. *Arch Biochem Biophys* 336, 151-156.
- Savkur, R.S., and Burris, T.P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *Journal of Peptide Research* 63, 207-212.
- Scott, N.L., Falzone, C.J., Vuletich, D.A., Zhao, J.D., Bryant, D.A., and Lecomte, J.T.J. (2002). Truncated hemoglobin from the cyanobacterium Synechococcus sp PCC 7002: Evidence for hexacoordination and covalent adduct formation in the ferric recombinant protein. *Biochemistry* 41, 6902-6910.
- Segraves, W.A., and Hogness, D.S. (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in Drosophila encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev* 4, 204-219.

- Sellers, V.M., Wu, C.K., Dailey, T.A., and Dailey, H.A. (2001). Human ferrochelatase: Characterization of substrate-iron binding and proton-abstracting residues. *Biochemistry* 40, 9821-9827.
- Siaussat, D., Mottier, V., Bozzolan, F., Porcheron, P., and Debernard, S. (2004). Synchronization of *Plodia interpunctella* lepidopteran cells and effects of 20-hydroxyecdysone. *Insect Molecular Biology* 13, 179-187.
- Smaghe, G. (2009). Ecdysone: structures and functions. In (New York, Springer), p. 590.
- Smith, D.W., and Williams, R.J.P. (1970). The Spectra of ferric haems and haemoproteins. *Struct Bond* 7, 1-45.
- Stehlin, C., Wurtz, J.M., Steinmetz, A., Greiner, E., Schule, R., Moras, D., and Renaud, J.P. (2001). X-ray structure of the orphan nuclear receptor RORbeta ligand-binding domain in the active conformation. *EMBO J* 20, 5822-5831.
- Stjohnston, D., and Nussleinvolhard, C. (1992). The Origin of Pattern and Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 68, 201-219.
- Stone, J.R., Sands, R.H., Dunham, W.R., and Marletta, M.A. (1995). Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 572-577.
- Swevers, L., Eystathioy, T., and Iatrou, K. (2002a). The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkworm *Bombyx mori*: hormonal control and ovarian expression. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1643-1652.
- Swevers, L., Ito, K., and Iatrou, K. (2002b). The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. *J Biol Chem* 277, 41637-41644.
- Tejero, J., Biswas, A., Haque, M.M., Wang, Z.Q., Hemann, C., Varnado, C.L., Novince, Z., Hille, R., Goodwin, D.C., and Stuehr, D.J. (2011). Mesohaem substitution reveals how haem electronic properties can influence the kinetic and catalytic parameters of neuronal NO synthase. *Biochem J* 433, 163-174.
- Thummel, C.S. (1995). From Embryogenesis to Metamorphosis - the Regulation and Function of *Drosophila* Nuclear Receptor Superfamily Members. *Cell* 83, 871-877.
- Thummel, C.S. (1996). Flies on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in Genetics* 12, 306-310.
- Vainshtein, B.K., Melikadamy, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Grebenko, A.I., Borisov, V.V., Bartels, K.S., Fita, I., and Rossmann, M.G. (1986). 3-Dimensional Structure of Catalase from *Penicillium-Vitale* at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 188, 49-61.
- Vickery, L.E. (1978). Spin states of heme proteins by magnetic circular dichroism. *Methods Enzymol* 54, 284-302.
- Vu, B.C., Nothnagel, H.J., Vuletich, D.A., Falzone, C.J., and Lecomte, J.T. (2004a). Cyanide binding to hexacoordinate cyanobacterial hemoglobins: hydrogen-bonding network and heme pocket rearrangement in ferric H117A *Synechocystis* hemoglobin. *Biochemistry* 43, 12622-12633.
- Vu, B.C., Vuletich, D.A., Kuriakose, S.A., Falzone, C.J., and Lecomte, J.T. (2004b). Characterization of the heme-histidine cross-link in cyanobacterial hemoglobins from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Biol Inorg Chem* 9, 183-194.
- White, K.P., Hurban, P., Watanabe, T., and Hogness, D.S. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* 276, 114-117.
- Wildemann, B., and Bicker, G. (1999). Developmental expression of nitric oxide cyclic GMP synthesizing cells in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology* 38, 1-15.
- Wilks, A. (2002). Analysis of Heme and Hemoproteins. In *Heme, Chlorophyll, and Bilins: Methods and Protocols*, A.G. Smith, and M. Witty, eds. (Totowa, Humana Press), pp. 157-184.
- Williams, P.A., Fulop, V., Garman, E.F., Saunders, N.F.W., Ferguson, S.J., and Hajdu, J. (1997). Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* 389, 406-412.
- Woo, E.J., Jeong, D.G., Lim, M.Y., Jun Kim, S., Kim, K.J., Yoon, S.M., Park, B.C., and Ryu, S.E. (2007). Structural insight into the constitutive repression function of the nuclear receptor Rev-erbalpha. *J Mol Biol* 373, 735-744.
- Woodard, C.T., Baehrecke, E.H., and Thummel, C.S. (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* 79, 607-615.
- Woodward, J.J., Martin, N.I., and Marletta, M.A. (2007). An *Escherichia coli* expression-based method for heme substitution. *Nat Methods* 4, 43-45.
- Wu, C.K., Dailey, H.A., Rose, J.P., Burden, A., Sellers, V.M., and Wang, B.C. (2001). The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nature Structural Biology* 8, 156-160.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3, 87-94.
- Yin, L., and Lazar, M.A. (2005). The orphan nuclear receptor Rev-erbalpha recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian *Bmal1* gene. *Mol Endocrinol* 19, 1452-1459.
- Yin, L., Wu, N., Curtin, J.C., Qatanani, M., Szewergold, N.R., Reid, R.A., Waitt, G.M., Parks, D.J., Pearce, K.H., Wisely, G.B., et al. (2007). Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* 318, 1786-1789.
- Zhang, X.H., Sato, M., Sasahara, M., Migita, C.T., and Yoshida, T. (2004). Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *European Journal of Biochemistry* 271, 1713-1724.
- Zheng, Y.M., Baer, B.R., Kneller, M.B., Henne, K.R., Kunze, K.L., and Rettie, A.E. (2003). Covalent heme binding to CYP4B1 via Glu310 and a carbocation porphyrin intermediate. *Biochemistry* 42, 4601-4606.